

AISLAMIENTO DE *Escherichia coli* O157:H7 EN MUESTRAS DE HECES DE GANADO BOVINO DOBLE PROPÓSITO DEL MUNICIPIO MIRANDA, ESTADO ZULIA, VENEZUELA.

Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Feces in Dual Purpose Cattle at Miranda Municipality, Zulia State, Venezuela.

Claudia A. Narváez-Bravo¹, Gabriela Carruyo-Núñez¹, Mireya Moreno¹, Argenis Rodas-González¹, Armando E. Hoet² y Thomas E. Wittum²

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia. ² Department of Veterinary Preventive Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohio, 43210. E-mail: claudianarvaez519@yahoo.es

RESUMEN

Escherichia coli O157:H7 es considerado un patógeno emergente a nivel mundial y potencialmente fatal en infecciones humanas. El ganado bovino es el reservorio primario de *E. coli* O157:H7, por lo que el objetivo de esta investigación fue dirigida a determinar la presencia de dicha bacteria en heces de ganado bovino de doble propósito del municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. Se procesaron 309 muestras fecales de 155 vacas y 154 becerros provenientes de 6 fincas. Las muestras fueron analizadas usando técnicas bacteriológicas convencionales, bioquímicas y serológicas, estas últimas con la utilización de monovalentes somáticos O157 y H7, y pruebas de aglutinación con látex para O157. En total se logró el aislamiento de seis cepas (1,94%) positivas a las pruebas de aglutinación para antígeno somático O157 y flagelar H7. Adicionalmente, se detectó una cepa O157 positiva no mótil (O157:NM). No se observó diferencias significativas ($P>0,05$) en la excreción de *E. coli* O157:H7 al comparar los dos grupos de animales estudiados. Los animales portadores de esta bacteria no mostraron signos clínicos de enfermedad, por lo que fueron considerados como portadores asintomáticos. En conclusión, los resultados de este estudio demuestran la presencia de *E. coli* O157:H7 en heces de vacas y becerros en el estado Zulia, los cuales pudieran considerarse como una fuente de exposición directa con este patógeno zoonótico, así como una fuente potencial de contaminación de productos alimenticios de origen bovino.

Palabras clave: *Escherichia coli* O157:H7, bovinos de doble propósito, Venezuela.

ABSTRACT

Escherichia coli O157:H7 is considered a worldwide emerging pathogen which is potentially fatal in humans. Cattle are known as one of the main reservoir of *E. coli* O157:H7. The aim of this research was to investigate the presence of *E. coli* O157:H7 in fecal material of dual purpose cattle from the Miranda Municipality at Zulia State, Venezuela. Three-hundred and nine fecal samples of 155 cows and 154 calves from 6 dual purpose farms were processed. Samples were analyzed by conventional bacteriological techniques, biochemical and serological tests, somatic monovalent O157 and flagellar H7. Also, a latex agglutination for somatic antigen O157. A total of six strains (1.94%) positives to the agglutination tests to detect somatic antigen O157 and flagellar H7 were obtained. Additionally a nonmotile O157 strain was also detected (O157:NM). Non significant differences were observed in the shedding of *E. coli* O157:H7 between cows and calves. The animals who shedding these bacteria did not show clinical signs of illness; therefore, they were considered as asymptomatic carriers. In conclusion, the presence of *E. coli* O157:H7 in feces from dual purpose cows and calves from this study, revealed that these animals could be considered a feasible source of direct exposure with this zoonotic pathogen, as well as a potential source of contamination of food products derived from those animals.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, dual purpose cattle, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, *Escherichia coli* O157: H7 (Enterohemorrágica, ECEH) ha sido considerado como un patógeno

emergente de gran impacto en la salud pública. Esta bacteria ha sido identificada como una cepa causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) a nivel mundial, principalmente por alimentos de origen bovino [2, 24].

Escherichia coli enterohemorrágica se caracteriza por producir diarrea y colitis hemorrágica en humanos [11]. Entre el 5% y 10% de las personas infectadas, en especial niños pequeños y ancianos, desarrollan una grave complicación denominada síndrome urémico hemolítico (SUH) [15, 31]. Los individuos que desarrollan el SUH, presentan anemia, bajo recuento de plaquetas e insuficiencia renal, con una tasa de letalidad estimada entre el 2% y 7% [35] y una tasa de secuelas a largo plazo que incluyen disfunción renal, lesión neurológica o hipertensión, entre un 12% y un 30% de los casos [15].

Aproximadamente, un tercio de los rumiantes domésticos son portadores asintomáticos de *Escherichia coli* O157:H7 y representan el principal reservorio para infecciones en humanos. Otros animales como cerdos, caballos y ciervos también son considerados como portadores de esta bacteria, pero no son la principal fuente [32]. Dentro de los rumiantes, el ganado bovino es reportado en varias investigaciones como uno de los principales portadores de *E. coli* O157:H7 [8, 21, 27].

ECEH es considerada, junto con otras cepas de *E. coli* productoras de toxinas shiga, como una causa importante de diarrea en becerros [32]. Los animales afectados cursan diarrea hemorrágica raramente mortal, sin embargo, causa deshidratación, debilidad y retardo del crecimiento. Los animales adultos pueden comportarse como portadores asintomáticos [32].

Los estudios de prevalencia de *E. coli* O157:H7 en Estados Unidos, han estimado que menos del 10% de los bovinos excretan este patógeno en las heces [22]. El tracto gastrointestinal del hospedero bovino generalmente es colonizado por esta cepa sin causar la enfermedad y se ha considerado que puede comportarse como un miembro transitorio de la flora intestinal [3, 8]. Un estudio realizado por Blanco y col. [4] sobre la incidencia de cepas verotoxigénicas de *E. coli* en España, detectó un 14% de (55/387) de dichas cepas provenientes de bovinos, incluyendo *E. coli* O157:H7, las cuales han sido involucradas en varios países con colitis hemorrágica y SUH; estos resultados indican que los bovinos pueden ser una fuente importante de *E. coli* verotoxigénicas y que podrían involucrarse con enfermedades en humanos.

En Centro y Sur América, específicamente en Argentina, Colombia y Costa Rica, se ha reportado la presencia del serotipo O157:H7 en el ganado bovino y en humanos con diarrea [5, 23, 25, 30].

La presencia de *E. coli* O157:H7 en las heces de bovinos parece estar influenciada por la edad del animal [8, 10, 20]. Así mismo, existen investigaciones en las que se ha encontrado, que los terneros menores de 8 semanas de edad y novillas excretan esta cepa más a menudo que el ganado adulto [14, 17].

En Venezuela, *E. coli* O157:H7 fue detectada por Bravo y Villalobos [6], en muestras de chorizo y carne molida obtenidos en el mercado municipal de Cumaná, estado Sucre, mientras que Arenas de Moreno y col. [1] y Narváez y col. [26], en canales bovinas y en carne de hamburguesa, respectivamente, no la detectaron.

La determinación de bacterias como *E. coli* O157:H7 en bovinos es esencial para la evaluación epidemiológica de las patologías provocadas por una posible infección y su impacto en salud pública. Es importante conocer los riesgos debido a la presencia de patógenos, tal como *E. coli* enterohemorrágica, que pudiesen estar presente en animales de abasto en Venezuela, a manera de garantizar la implementación de programas sanitarios a nivel de la producción primaria que sean eficientes.

En vista de que los bovinos son considerados reservorios asintomáticos de la cepa enterohemorrágica *E. coli* O157:H7 y es poca la información disponible al respecto en el país, el objetivo principal de este trabajo fue determinar la presencia *E. coli* O157:H7 en heces de vacas adultas y becerros de doble propósito en fincas del estado Zulia, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Area de Estudio

El muestreo estuvo circunscrito al noreste del estado Zulia, municipio Miranda. El clima y la vegetación reinante corresponde a bosque seco tropical, con temperatura promedio de 28°C y una precipitación que oscila entre los 125 a 500 mm/año (Ministerio de Agricultura y Cría – Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1976).

Las muestras fueron recolectadas en 6 fincas de doble propósito durante un periodo de dos (2) meses (abril-mayo). Se utilizó un muestreo al azar restringido, recolectando un total de 309 muestras, correspondientes a 155 vacas en producción y 154 becerros (de un día hasta 12 meses de edad). En la TABLA I, se ilustra la distribución de observaciones para evaluar la presencia de *E. coli* O157:H7 por finca y grupo etario. Adicionalmente se levantó una encuesta epidemiológica con la finalidad de determinar si habían diferencias en el manejo de los animales en las diferentes fincas (TABLA II).

Las muestras se tomaron de manera manual utilizando guantes de palpación y una bolsa plástica estéril individual identificada para cada animal, evitándose así la contaminación entre muestras. Las bolsas al final de la recolección se llevaron en cavas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia (LUZ), donde fueron procesadas en un tiempo no mayor a dos horas después de haber sido tomadas.

Cultivo y aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7

Se realizó un paso primario de enriquecimiento selectivo, con la finalidad de optimizar el aislamiento de *E. coli*. Se

tomó 1 gr de heces y se colocó en tubos que contenían 10 ml de caldo tripticasa soya modificado con sales biliares y novobiocina (CTSm) [10]. Posteriormente, los tubos fueron incubados 24 horas a una temperatura de 37°C. Finalizada la incubación en CTSm, se procedió a sembrar las muestras por rayado en placas de agar MacConkey sorbitol suplementado con telu-

rito de potasio y cefixime (SMACct, Oxoid®). El agar SMACct, es un medio selectivo para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 no fermentadora del sorbitol, con la substitución de la lactosa por 1% de D-Sorbitol, dicha bacteria no es capaz de fermentar el sorbitol en 24 horas [11, 28]. Las placas una vez sembradas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias no fermentadoras del sorbitol, las cuales se caracterizan por presentar un aspecto grisáceo transparente. Como control positivo se utilizó una cepa control *E. coli* O157:H7 (Cepa de la Colección Española N° 5947).

TABLA I
DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA DETECCIÓN
***E. coli* O157:H7 POR FINCA Y GRUPO ETARIO/**
EXPERIMENTAL DESIGN FOR THE DETECTION
OF *E. coli* O157:H7 BY FARM AND AGE GROUP.

Finca	Vacas	Becerras	Total
A	14	11	25
B	29	29	58
C	31	28	59
D	24	34	58
E	26	28	54
F	31	24	55
Total	155	154	309

Identificación de *Escherichia coli* O157:H7

Las colonias típicas en el medio SMACct fueron sembradas en tubos que contenían agar triple azúcar hierro (TSI). Las colonias que mostraron reacciones bioquímicas típicas de bisel y taco ácido, con o sin producción de gas en agar TSI, fueron seleccionadas y preservadas en tubos con agar nutritivo, con la finalidad de realizar posteriormente pruebas bioquímicas (citocromo oxidasa, malonato, ureasa, citrato, voges-proskauer, indol, prueba ONPG, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, rojo de metilo, motilidad) y serológicas [13].

TABLA II
ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA/ EPIDEMIOLOGICAL SURVEY

VARIABLES	n	%	VARIABLES	n	%
<i>Registros</i>			<i>Otros animales en la finca</i>		
Avanzados*	2	33,3	Equinos	6	100
Básicos**	4	66,6	Perros	6	100
<i>Tipo de Ordeño</i>			Ovinos	1	16,6
Manual	5	83,3	Aves	6	100
Mecánico	1	16,5	Suinos	1	16,6
<i>Tipo de Vaquera</i>			<i>Nutrición</i>		
Con techo	6	100	Pasto	6	100
Sin techo		0	Pasto de corte	1	16,6
Con piso	6	100	Heno	0	0
Sin piso		0	Concentrado	2	33,3
<i>Tipo de Limpieza de la vaquera</i>			Cebada	0	0
Solo raspado	0	0	Yacija	1	16,6
Solo lavado	0	0	Melaza	3	50
Raspado y lavado	6	100	Minerales	6	100
<i>Fuente de agua</i>			Otros		0
Jagüey	2	33,3	<i>Asistencia Veterinaria</i>		
Pozo	6	100	Sí	6	100
Río	1	16,6	No	0	0
Acueducto	0	0			

*Básicos: sólo poseen registros de tarjeta: datos reproductivos básicos, pesada de leche y nacimientos. ** Avanzados: adicional a los básicos se llevan registros sanitarios, mortalidad, morbilidad y ganancia de peso.

Las cepas con características bioquímicas compatibles con *Escherichia coli* fueron conservadas y posteriormente sembradas en placas de agar bilis rojo violeta, suplementado con 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronido (MUG), con la finalidad de seleccionar aquellas colonias MUG negativas. La reacción MUG negativa es una característica distintiva de las cepas de *E. coli* O157:H7, las cuales no sintetizan la enzima β -D-glucuronidasa, a diferencia del resto de las cepas de *E. coli* O157:H7, que si la producen [10, 19, 29].

Pruebas Serológicas

Consistió en pruebas de aglutinación con antisueros monovalentes somático (O157) y flagelar (H7) (Denka Seiken®), las cuales se procesaron según las recomendaciones de la casa comercial. Adicionalmente, se realizaron pruebas de aglutinación con partículas de látex sensibilizadas para antígeno somático O157 (Oxoid®), la cual incluye controles positivos y negativos. Se comprobó que las cepas no fueran autoaglutinantes previo a ser sometidas a las pruebas serológicas.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados a través del Sistema de Análisis Estadístico (SAS) [33]. Se realizó un análisis de Ji-cuadrado para determinar las diferencias entre las frecuencias de detección de *E. coli* O157:H7 por finca, por grupo (vacas y becerros), por grupos etarios de becerros (1 a 4 meses vs. 5 a 8 meses); basados en la proporción de muestras positivas a *E. coli* O157:H7. La prueba exacta de Fisher fue utilizada cuando el número de observaciones por celda fue menor a 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de *E. coli* (O157:H7)

Se aisló un total de 76 (24,6%) cepas sorbitol negativas a partir de las 309 muestras de heces, las cuales mostraron características típicas de *E. coli* en agar TSI y en las pruebas bioquímicas realizadas. Al analizar todas las cepas presuntivas, 7/76 (9,2%) resultaron positivas a la prueba de antígeno somático (O157); de estas 7 cepas, 6 cepas resultaron positivas a la prueba de antígeno flagelar (H7) y 5 positivas a la prueba de aglutinación con látex (O157). Sólo una de las 7 cepas, positivas al antígeno somático, resultó negativa a la prueba de aglutinación con el monovalente flagelar, lo cual corroboró el resultado negativo obtenido con esa cepa para la prueba de motilidad.

Frecuencia de detección de *E. coli* O157:H7 según la finca y grupo etario

De las seis fincas muestreadas, solo se aisló e identificó *E. coli* O157:H7 en tres de ellas. En la encuesta levantada (TABLA III), no se observaron mayores diferencias de manejo, nutrición y ambiente que expliquen la presencia de estos patógenos en dichas fincas.

Los análisis realizados para determinar la diferencia en la frecuencia de excreción de *E. coli* O157:H7 en los dos grupos etarios estudiados (vacas y becerros) no revelaron diferencias significativas ($P>0,05$) (TABLA IV). Se identificaron 4 (1,29%) cepas de *E. coli* O157:H7 en vacas y 2 (0,64%) en becerros. Al segregar los becerros por edad, se encontró que los animales mayores de 4 meses fueron los que presentaron dos cepas positivas a ambos monovalentes; siendo un becerro menor a 4 meses el que presentó la cepa de *E. coli* O157 no mótil. El porcentaje de excreción de *E. coli* O157:H7, obtenido en animales adultos en este estudio (1,29%) es mucho menor a lo reportado por Thran y col. [34] y Hancock y col. [18] (8,3%). Estas diferencias en los porcentajes de excreción, podrían deberse a las prácticas de manejo y las condiciones climáticas de países como Estados Unidos o países europeos, donde se han generado la mayoría de las investigaciones de prevalencia y excreción de *E. coli* O157:H7.

No se encontraron diferencias significativas en la excreción de *E. coli* O157:H7 entre becerros menores y mayores

TABLA III
CEPAS POSITIVAS POR FINCA PARA LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN CON ANTÍGENO SOMÁTICO O157, FLAGELAR H7 Y AGLUTINACIÓN CON LÁTEX/ POSITIVE STRAINS FOR SOMATIC O157 AND FLAGELLAR H7 ANTIGENS AND LATEX AGLUTINATION BY FARM.

Finca	Antígeno O157 (%*)	Flagelar H7 (%*)	O157 Látex (%*)
A	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B	1 (0,32)	1 (0,32)	1 (0,32)
C	5 (1,6)	4 (1,29)	4 (1,29)
D	0 (0)	0 (0)	0 (0)
E	1 (0,32)	1(0,32)	0 (0)
F	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	7 (2,26)	6 (1,94)	5 (1,61)

*: Los porcentajes fueron calculados en base al total de muestras procesadas.

TABLA IV
NÚMERO DE CEPAS POSITIVAS PARA LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN CON ANTÍGENO SOMÁTICO O157, FLAGELAR H7 Y AGLUTINACIÓN CON LÁTEX SEGÚN EL GRUPO ETARIO/ POSITIVE STRAINS FOR SOMATIC O157 AND FLAGELLAR H7 ANTIGENS AND LATEX AGLUTINATION BY AGE GROUP

Grupo Etario	Antígeno O157 (%*)	Flagelar H7 (%*)	O157 Latex (%*)
Vaca	4 (1,29)	4 (1,29)	2 (0,64)
Becerro	3 (0,97)	2 (0,64)	3 (0,97)
Total	7 (2,26)	6 (1,94)	5 (1,61)

*: Los porcentajes fueron calculados en base al total de muestras procesadas.

de 4 meses de edad ($P>0,05$), a diferencia de lo reportado por Faith y col. [12] y Zhao y col. [36], que si encuentran diferencias significativas. El porcentaje de excreción de *E. coli* O157:H7 obtenido para estos grupos etarios fue menor (0,97%) al reportado por otros autores (1,5 a 5%) [16]. Algunas investigaciones indican [12, 36], que es más frecuente aislar este organismo en becerros cuyas edades estén comprendidas entre 2 y 4 meses, que en aquellos con edades por debajo de los dos meses. Hancock y col. [16] han reportado que la excreción de *E. coli* O157:H7 es mayor en becerros destetados que en lactantes. Durante la realización de este estudio, no fue posible muestrear becerros destetados dado que, en la mayoría de las fincas muestreadas los becerros son destetados alrededor de los 9 meses.

Los animales positivos a *E. coli* O157:H7 no mostraron signos clínicos de diarrea. Estos animales con posibles infecciones subclínicas, podrían comportarse como portadores asintomáticos y actuar como posibles fuentes de infección para el hombre, ya que éstos pasarían desapercibidos en el sistema de producción. El hecho de que estos animales excretan *E. coli* sin mostrar signos clínicos de enfermedad, coincide con lo observado en otras investigaciones, en las cuales han encontrado que la mayoría de los animales que portan este organismo permanecen saludables [8, 9, 11, 20, 32].

La falta de relación de 2 de las cepas que fueron positivas al monovalente somático, y negativas a la prueba de aglutinación con látex para O157, podría deberse a que dicha prueba de aglutinación de látex, aún cuando es recomendada en trabajos de investigación como un método sensible de diagnóstico para esta cepa [28], parece estar presentando una sensibilidad menor a la presentada por los antisueros monovalentes. Previo a realizar las pruebas serológicas, se evaluaron las características de todas las colonias en cuanto a reacciones falso positivas, como suele suceder en el caso de cepas rugosas, que tienden a la auto aglutinación, y ninguna de ellas auto aglutinó cuando se homogeneizaron con solución salina fisiológica.

Aún cuando no se comprobó la virulencia de las cepas aisladas de *E. coli* O157:H7 a través de la determinación de toxinas vero 1 y 2 y/o del gen *eae* (adherencia) [32], el hecho de que estas cepas hayan mostrado resultados positivos a ambas pruebas (monovalente O157, monovalente H7 y pruebas de aglutinación con látex para O157), indican que esta bacteria esta presente en el ganado de la zona y evidencian peligro de diseminación hacia otras regiones del país y otras adyacentes, lo que concuerda con los hallazgos de Bravo y Villalobos [6], donde se evidencio la presencia de esta bacteria en productos cárnicos obtenidos en un mercado de Cúmana.

En países de América Latina (Colombia, Costa Rica, Brasil y Argentina) se ha reportado la presencia de *E. coli* O157:H7 como patógeno [7, 23, 30], por lo que se considera de importancia la frontera como puerta de entrada y distribución de esta bacteria, lo cual indica que se deben comenzar a establecer sistemas de vigilancia epidemiológica en las fronte-

ras venezolanas, con la finalidad de evitar una mayor diseminación de este agente en el país.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Muestras procedentes de ganado bovino de doble propósito presente en el municipio Miranda del estado Zulia, mostraron ser portadores asintomáticos de *E. coli* O157:H7 en el 1,9% del ganado muestreado. La presencia de *E. coli* O157:H7 no estuvo influenciada por el grupo etario.

Al resultar positivas para *Escherichia coli* O157:H7, 3 de las 6 fincas muestreadas, se recomienda la realización de un estudio epidemiológico para poder establecer los factores de riesgo que estan incidiendo en la presencia o no de este patógeno. También es importante la utilización de pruebas más específicas como PCR, para determinar el grado de virulencia de dichas cepas bacterianas mediante la determinación de la presencia de genes para producción de verotoxinas 1 y 2, así como del gen *eae* (factor de adherencia).

Los resultados obtenidos en este trabajo representan un aporte considerable para la salud pública, lo que amerita aún más la implementación de programas sanitarios a nivel de la producción ganadera primaria y así evitar la contaminación de alimentos por *E. coli* O157:H7.

La aplicación de las Buenas Prácticas de Fabricación de alimentos (BPF) y del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), tanto a nivel de granjas como a nivel industrial, podrían ayudar a minimizar el riesgo de los consumidores a contraer síndromes diarreicos causados por este patógeno.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del CONDES-LUZ, de la Universidad de Ohio, USA y del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ. Se hace un especial agradecimiento a todas las explotaciones ganaderas que aportaron su colaboración durante la recolección de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARENAS DE M., L.; HUERTA-LEIDENZ, N.; ORTIZ, Y.; VALERA-MATOS, M.; SMITH, C.G. Microbiological Contamination on Beef Carcasses in a Small Abattoir in Venezuela. Departmental Research Reports Colorado State University En línea. <http://ansci.colostate.edu/content/view/51/>. 2004.
- [2] ARMSTRONG, G.L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS J. G.JR. Emerging Foodborne Pathogens: *E. coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.* 18(1):29-51. 1996.

- [3] BESSER, R.E.; GRIFFIN, P.M.; SLUTSKER, L. *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease. **Annual. Rev. Med.** 50:355-367. 1999.
- [4] BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; ALONSO, M.P.; MAAS, H.; JENSEN WH. Prevalence and characteristics of Human and bovine verotoxinogenic *Escherichia coli* strains isolate in Galicia (north-western Spain). **Eur J Epidemiol.** 12 (1): 13-19. 1996
- [5] BLANCO, M.; PADOLA, N.L.; KRUGER, A.; SANZ, M.E.; BLANCO, J.E.; GONZÁLEZ, E.A.; DHABI, G.; MORA, A.; BERNARDEZ, M.I.; ETCHEVERRIA, A.I.; ARROYO, G.H.; LUCHESSI, P.M.; PARMA, A.E.; BLANCO, J. Virulence genes and intimin types of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. **Int. Microbiol.** 7(4):269-276. 2004.
- [6] BRAVO, V.J.B.; VILLALOBOS DE B., L.B. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.** 22 (2): 119-121. 2002.
- [7] CERQUEIRA, A.M.; GUTH, B.E.; JOAQUIN, R.M.; ANDRADE, J.R. High occurrence of shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Microbiol.** 70(1-2): 111-121. 1999.
- [8] CHAPMAN, P.A.; SIDONS, C.A.; WRIGHT, D.J.; NORMAN, P.; FOX, J.; CRICK, E.; Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. **Epidemiol. Infect.** 111(3):439-447. 1993.
- [9] CRAY, W.C.; MOON, H. Experimental Infection of Calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. **Appl. And Enviro Microbiol.** 6(4):1586-1590. 1995.
- [10] DOYLE, M.P.; SHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meat and poultry. **Appl. Environ. Microbiol.** 53(10):2394-2396. 1987.
- [11] DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S. *Escherichia coli* O157:H7. In Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. (Eds.), **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Chap. 10. ASM. Press, Washington DC.; EE.UU. 171-189pp. 1997.
- [12] FAITH, N.G.; SHERE, J.A.; BROSCHE, R.; ARNOLD, K.W.; ANSAY, S.E.; LEE, M.S.; Luchansky, J.B.; Kaspar, C.W. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on Dairy Farms on Wisconsin. **Appl. Environ. Microbiol.** 62(5):1519-1521. 1996.
- [13] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. Published and Distributed by AOAC International. 8th Ed. En línea: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>. 2002.
- [14] GARBER, L.P.; WELLS, S.J.; HANCOCK, D.D.; DOYLE, M.P.; TUTTLE, J.; SHERE, J.A.; ZHAO, T. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. **J. Am. Vet. Med. Ass.** 207(1):46-49. 1995.
- [15] GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. In Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL (Eds). **Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press Ltd, 739-761 pp. 1995.
- [16] HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; RICE, D.H.; HERRIOT, D.E.; TARR, P.I. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in fourteen cattle herds. **Epidemiol. Infect.** 118 (2): 193-195. 1997.
- [17] HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; RICE, D.H.; EBEL, E.D.; HERRIOT, D.E.; CARPENTER, L.V.; Multiple sources of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. **Prev Vet Med.** 35 (1): 11-19. 1998.
- [18] HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; KINSELL, M.L.; TARR, P.I.; RICE, D.H.; PAROS, M.G. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiol. Infect.** 113(2):199-207. 1994.
- [19] KILLIAN, M.; BULOW. P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B** 84:245-251. 1976.
- [20] LAEGREID, W.W.; ELDER, R.O.; KEEN, J.E. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in range beef calves at weaning. **Epidemiol. Infect.** 123(2): 291-298. 1999.
- [21] LOCKING, M.E.; O'BRIEN, S.J.; REILLY, W.J.; WRIGHT, E.M.; CAMPBELL, D. M.; COIA, J.E.; BROWNING, L.M.; RAMSAY, C.N. Risk factors for sporadic cases of *Escherichia coli* O157 infection: the importance of contact with animal excreta. **Epidemiol. Infect.** 127(2):215-220. 2001.
- [22] LOW, J.C.; MCKENDRINCK, I.J.; MCKECHNIE, C.; FENLON, D.; NAYLOR, S.W.; CURRIE, C.; SMITH, D.G.E.; ALLISON, L.; GALLY, D.L. Rectal carriage of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. **Appl. Environ. Microbiol.** 71(1):93-97. 2005.
- [23] MATTAR, S.; VÁSQUEZ, E. *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Colombia. Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. **Emerging Infectious Diseases**. Letters. 4(1). En línea: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol4no1/letters.htm>. 1998.
- [24] MCDONOUGH, P.L.; ROSSITER, C.A.; REBHUN, R.B.; STEHMAN, S.M.; LEIN, D.H.; SHIN, S.J. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 from cull dairy cows in New York State and comparison of culture methods used during preharvest food safety investigations. **J. Clin. Microbiol.** 38(1): 318-322. 2000.

- [25] MEICHTRI, L.; MILIWEBSKY, E.; GIOFFRE, A.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; CHILLEMI, G.; GUTH, B.E.; MASANA, M.O.; CATALDI, A.; RODRIGUEZ, H.R.; RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. **Int . J. Food. Microbiol.** 96(2):189-98. 2004.
- [26] NARVÁEZ, C.A.; PARRA, K.C.; HUERTA-LEIDENZ, N.; RODAS-GONZÁLEZ, A.; ARENAS DE M., L. Aislamiento de *Salmonella* y *Escherichia coli* patógenas durante el procesamiento de hamburguesas en una pequeña planta de Maracaibo, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XV (6): 551- 559. 2005.
- [27] ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; VILLAR, J.A. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet.** 2(8553):276. 1987.
- [28] PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 Epidemiology, Pathogenesis and Methods for Detection in foods. **J. Food. Protec.** 55(7):555-565. 1992.
- [29] PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.** 11(3). 450-479. 1998.
- [30] REUBEN, A.; TREMINIO, H.; ARIAS, M.; VILLALOBOS, L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Costa Rican Food. **Rev. Biomed.** 13(4):273-276. 2002.
- [31] RILEY, LW.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L.; Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N Engl. J. Med.** 308(12): 681-5. 1983.
- [32] SONGER, J.G.; POST, W.K. The Genera *Escherichia coli* and *Shigella*. Elsevier Saunders. **Veterinary Microbiology. Bacterial and Fungal Agent of Animal Diseases.** Chap. 13. 113-119pp. 2005.
- [33] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). User's guide: Statistic. Releases 6,03, Cary, NC. 94pp.1996.
- [34] THRAN, B.H.; HUSSEIN, H.S.; HALL, M.R.; KHAIBOULLINA, S.F. Shiga toxin producing *Escherichia coli* in beef heifers grazing and irrigated pasture. **J. Food. Protect.** 64: 1613-1616. 2001.
- [35] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO consultation. Geneva-Switzerland. 43pp. 1997.
- [36] ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; SHERE, J.; GARBER, L. Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1290-1293. 1995.