



## Identification of *Escherichia coli* pathotypes in ground beef from butcher shops of Guadalajara, Jalisco, Mexico

## Identificación de patotipos de *Escherichia coli* en carne molida de expendios de Guadalajara, Jalisco, México

Cardona-López, M. A., Padilla-Frausto, J. J., Madriz-Elisondo, A. L., Hinojosa-Dávalos, J., Navarro-Villarruel, C. L., Varela-Hernández, J. J., Ibarra-Velázquez, L. M.\*

Laboratorio de Ciencias Médicas. Departamento de Ciencias Médicas y de la Vida. División de Desarrollo Bio-Tecnológico. Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad, No.1115, Col. Lindavista, CP 47820, Ocotlán, Jalisco, México.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Cardona-López, M. A., Padilla-Frausto, J. J., Madriz-Elisondo, A. L., Hinojosa-Dávalos, J., Navarro-Villarruel, C. L., Varela-Hernández, J. J., Ibarra-Velázquez, L. M. (2020). Identification of *Escherichia coli* pathotypes in ground beef from butcher shops of Guadalajara, Jalisco, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 7, e924. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e924>



### ABSTRACT

According to Mexican Meat Council, in 2017, the national production of beef was 1,915 million tons. Ground bovine meat has been implicated in numerous disease outbreaks since 1982, particularly caused by *Escherichia coli* pathotypes. From March to November 2014, 100 samples of ground beef, obtained from butcher's shops in Guadalajara, Jalisco, were analyzed with the purpose of isolating and identifying *Escherichia coli* pathotypes. To this end, the method proposed by the Bacteriological Analytical Manual (BAM) of the Food and Drug Administration (FDA) was used. Pathotypes were identified by means of the amplification of genes encoding virulence factors, using multiplex PCR. Seventy-six suspect strains for pathogenic *Escherichia coli* were isolated, from 15 samples. Only 72.36 % (55/76) of the

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: January 29<sup>th</sup> 2020.

Accepted/Aceptado: July 09<sup>th</sup> 2020.

Available on line/Publicado: August 13<sup>th</sup> 2020.

#### \*Corresponding Author:

Ibarra-Velázquez, L. M. PhD. Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad, No.1115, Col. Lindavista, CP 47820, Ocotlán, Jalisco, México. Phone: +52 392 925 9400 ext. 48378. E-mail.: [luz.ibarra@academicos.udg.mx](mailto:luz.ibarra@academicos.udg.mx) <https://orcid.org/0000-0001-8265-5630>

### RESUMEN

Según el Consejo Mexicano de la Carne, en el 2017, la producción nacional de carne de bovino fue de 1,915 millones de toneladas. La carne molida de bovino se ha visto implicada en numerosos brotes de enfermedad desde 1982, particularmente causados por patotipos de *Escherichia coli*. Durante los meses de marzo a noviembre del 2014, se analizaron 100 muestras de carne de bovino molida, obtenida de carnicerías de Guadalajara, Jalisco, con el objetivo de aislar e identificar patotipos de *Escherichia coli*. Para tal efecto, se empleó el método del Manual de Bacteriología Analítica (BAM, siglas en inglés) de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA; siglas en inglés). La identificación de los patotipos fue mediante la amplificación de genes que codifican para factores de virulencia, mediante PCR multiplex. Se aislaron 76 cepas sospechosas de *Escherichia coli* patógena, de 15 muestras. Solo 72.36 % (55/76) de las cepas presuntivas de *Escherichia coli* amplificaron el gen *gadA/B*, lo que confirma el género y especie. El 7.27 % (4/55) mostraron el gen *aggR* propio de EAEC y el 41.18 % (23/55) el gen *eft* que codifican para la toxina termolábil de ETEC. Es evidente

presumptive strains of *Escherichia coli* amplified the *gadA/B* gene, confirming the genus and species. Only 7.27 % (4/55) showed the *aggR* gene encoding for EAEC and 41.18 % (23/55) the *elt* gene encodes for ETEC's heat-labile enterotoxin. The potential risk resulting from the consumption of ground beef from butcher's shops in Guadalajara, Jalisco, was evidenced.

---

## KEY WORDS

---

Raw ground beef, Butcher's shop, *Escherichia coli* pathotype, multiplex PCR.

---

## Introduction

Diarrhea continues to be an important health issue worldwide (Thakur *et al.*, 2018), particularly in developing countries and children younger than 5 years old and in the elderly. Its etiology can be viral, bacterial or parasitic. Viruses represent 70 to 90 % of diarrhea cases in children; and bacteria from 10 to 20 %. such as *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, enterotoxigenic *Escherichia coli* and less frequent enteroinvasive *Escherichia coli*. With respect to parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium* spp represent less than 5 % of cases (Florez, 2020). Among the bacteria associated with diarrhea there are different *Escherichia coli* (*E. coli*) pathotypes, which colonize the human intestine, can directly spread from person to person, from animal to person or indirectly through water or contaminated food (Sperandio & Nguyen, 2012). According to its pathogenesis and epidemiologic characteristics, this group of bacteria is classified into six pathotypes: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive (EIEC), enteroaggregative (EAEC), diffusely adherent (DAEC) and enterohemorrhagic (EHEC), Shiga toxin-producing (STEC), as well as toxin producer Verocytotoxin-producing (VTEC) (Kaper *et al.*, 2004). The Center for Disease Control and Prevention of the United States (CDC) published in its morbidity and mortality weekly report that ETEC has been related with diverse outbreaks associated to foods and water in developed and developing countries (CDC, 1994; FDA, 2011). Since O157:H7 *E. coli* is frequently found in stool of cattle, this is one of the main sources of contamination toward beef and its derivatives; due to sanitary deficiencies during working, slaughter, and eviscerating for obtaining the carcass (Stanley *et al.*, 2017). Consumption of poorly

el riesgo potencial que implica el consumo de carne molida de establecimientos de Guadalajara, Jalisco.

---

## PALABRAS CLAVE

---

Carne molida de bovino, Carnicería, Patotípos de *Escherichia coli*, PCR multiplex.

---

## Introducción

La diarrea, continua siendo un importante problema de salud en el mundo (Thakur *et al.*, 2018), particularmente en los países en vías de desarrollo y en niños menores de 5 años y adultos mayores. Su etiología puede ser viral, bacteriana o parasitaria. Los virus representan del 70 al 90 % de los casos de diarrea en niños; y de 10 a 20 % las bacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* enteroxigénica y menos frecuente *Escherichia coli* enteroinvasiva. Respecto a los parásitos *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium* spp representan menos del 5 % de los casos (Flores, 2020). Entre las bacterias asociadas con la diarrea están los diferentes patotipos de *Escherichia coli* (*E. coli*), las cuales colonizan el intestino del ser humano, pueden transmitirse directamente de persona a persona, de animal a persona o indirectamente a través del agua o los alimentos contaminados (Sperandio & Nguyen, 2012). Según su patogénesis y sus características epidemiológicas, este grupo de bacterias se clasifica en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), difusamente adherente (DAEC) y la enterohemorrágica (EHEC), tanto la productora de toxina Shiga (STEC), como la productora de toxina Vero (VTEC) (Kaper *et al.*, 2004). El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, siglas en inglés) en su reporte semanal de morbilidad y mortalidad publicó que ETEC se ha relacionado con diversos brotes asociados a los alimentos y agua en países desarrollados y subdesarrollados (CDC, 1994; FDA, 2011). Debido a que *E. coli* O157:H7 se encuentra frecuentemente en materia fecal de ganado bovino, ésta es una de las principales fuentes de contaminación hacia la carne de res o sus derivados; por deficiencias sanitarias durante el faenado, matanza y eviscerado para la obtención de la canal (Stanley *et al.*, 2017). El consumo de carne molida de bovino mal cocida y contaminada con EHEC ha sido

cooked and contaminated ground beef with EHEC has been a cause of bloody diarrhea that can evolve into hemolytic-uremic syndrome (HUS) (Surendran-Nair, 2017). Beef carcass and its derived cuts have been reported as the source of infection in many outbreaks caused by EHEC (Barham *et al.*, 2002). The first outbreak documented in the United States of America (USA) was in 1982, which was associated to ground beef, and up to day, it remains as the most common vehicle among disease outbreaks caused by *E. coli* pathotypes (Ranger *et al.*, 2005). O157:H7 serotype is the main cause of outbreaks associated to *E. coli* in USA (Karmali *et al.*, 2010).

Bovine meat has been observed to be implicated into outbreaks by EHEC worldwide and in Mexico it is a staple food (Kiranmayi *et al.*, 2010; INEGI, 2018), reason why it is important to demonstrate the potential presence of the different *E. coli* pathotypes in food. In this context, the aim of the work was to isolate and identify *E. coli* pathotypes in ground beef, sold in butcher's shops in Guadalajara, Jalisco.

## Material and Methods

### Samples collecting

For this descriptive study of prevalence, total of 100 samples of ground beef were collected, 100 from "traditional" butcher's shops (10 per month) in Guadalajara, Jalisco. The sampling period was comprised from February to November 2014 (Table 1), warm months for this region, in order to increase the possibility of isolation according to recommendations of the study of Varela-Hernández *et al.* (2007) and Cagney *et al.* (2004). A sample bigger than 50 g was collected in a sampling bag (Speci-Sponge, Nasco Whirl-Pak®, Modesto, Ca, USA) and transported in containers with refrigerant gel (4-8 °C), to the Laboratory of Medical Sciences of the Ciénega University Center for its analysis in a time no longer than 24 h.

### Microbiologic analysis

For this study, a sample of 25 g of fresh ground beef was taken, to which 255 mL of diluent were added, prepared with casein peptone (BD®, Bioxon®, Becton Dickinson®, México) and 0.85 % NaCl (Sigma-Aldrich®, México). Afterwards, the sample was homogenized by using a homogenizer (Stomacher® Biomaster 80, Port Saint Lucie, FL, USA), at a velocity of 60 rpm, for two minutes. For the isolation of suspect strains of pathogenic *E. coli* (EIEC,

causa de diarrea sanguinolenta que puede evolucionar hasta síndrome urémico hemolítico (HUS) (Surendran-Nair, 2017). La canal de res y sus cortes derivados se han reportado como la fuente de infección en muchos brotes causados por EHEC (Barham *et al.*, 2002). El primer brote documentado en Estados Unidos de América (USA) fue en 1982, el cual, estuvo asociado a carne molida de res, que hasta la actualidad permanece como el vehículo más común entre los brotes de enfermedad provocados por patotipos de *E. coli* (Rangel *et al.*, 2005). El serotipo O157:H7 es el principal causante de brotes asociados a *E. coli* en USA (Karmali *et al.*, 2010).

La carne de bovino se ha visto implicada en brotes por EHEC alrededor del mundo, y en México es uno de los alimentos contemplados en la canasta básica (Kiranmayi *et al.*, 2010; INEGI, 2018), razón por la cual es importante evidenciar la presencia potencial de los diferentes patotipos de *E. coli* en el alimento. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar patotipos de *E. coli* en carne molida de bovino, que se expenden en carnicerías en Guadalajara, Jalisco.

## Material y Métodos

### Recolección de muestras

Para este estudio descriptivo de prevalencia, se recolectaron un total de 100 muestras de carne molida de res, de 100 carnicerías (10 por mes) "tradicionales" de Guadalajara, Jalisco. Se seleccionó como periodo de muestreo el comprendido entre los meses de marzo a noviembre del 2014 (Tabla 1), meses cálidos para esta región, para incrementar la posibilidad de aislamiento según recomiendan en su estudio Varela-Hernández *et al.* (2007) y Cagney *et al.* (2004). Una muestra mayor de 50 g se colectó en bolsa para muestra (Speci-Sponge, Nasco Whirl-Pak®, Modesto, CA, USA) y se transportó en contenedores con gel refrigerante (4-8 °C), hasta el Laboratorio de Ciencias Médicas del Centro Universitario de la Ciénega para su análisis en un tiempo no mayor de 24 h.

### Análisis microbiológico

Se consideró para el estudio una muestra de 25 g de carne molida fresca y se le adicionaron 255 mL de diluyente, preparado con peptona de caseína (BD®, Bioxon®, Becton Dickinson®, México) y NaCl al 0.85 % (Sigma-Aldrich®, México). Posteriormente, se homogeneizó la muestra empleando un homogeneizador (Stomacher® Biomaster 80, Port Saint Lucie, FL, USA) a una velocidad de 60 rpm, durante dos minutos. Para el aislamiento de las cepas sospechosas

**Table 1.**  
**Distribution of *Escherichia coli* pathotypes detected, according to month of isolation.**

**Tabla 1.**  
**Distribución de patotipos de *Escherichia coli* detectados, según mes de aislamiento.**

Month	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November
Positive samples ECET	0	0	3	4	3	2	0	1	0	0
Positive samples ECEA	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0

EPEC, ETEC, DAEC AND EAEC), the method proposed by the FDA (2011) was used, where the isolations were realized in eosin methylene blue agar (EMB agar) (bluish-black colonies with metallic green shine) and MacConkey agar (large colonies, intense pink with precipitation halo). For enterohemorrhagic *E. coli*, the protocol proposed by Varela *et al.* (2007) was followed, in which isolation was performed using immunomagnetic separation with Dynabeads® (DynaL Biotech, Norway), immunomagnetic beads were inoculated in MacConkey agar with sorbitol supplemented with Cefixime and Tellurite (colorless or beige colonies) and CHROMagar® agar (mauve colonies). Biochemical tests for the isolated strains were realized using the API20E system (bioMérieux, France). Control pathotypes used in this study were shown on Table 2.

de *E. coli* patógena (EIEC, EPEC, ETEC, DAEC y EAEC) se siguió el método propuesto por la FDA (2011), en el que los aislamientos se realizaron en agar EMB (colonias color negro azulado con brillo verde metálico) y Agar MacConkey (colonias grandes, rosa intenso con halo de precipitación). Para *E. coli* enterohemorrágica se siguió el protocolo propuesto por Varela *et al.* (2007) en el que el aislamiento se realizó utilizando separación inmunomagnética con Dynabeads® (DynaL Biotech, Norway), las perlas inmunomagnéticas se inocularon en agar MacConkey con sorbitol suplementado con Cefixima y Telurito (colonias incoloras o beige) y el agar CHROMagar® (colonias color malva). Las pruebas bioquímicas para las cepas aisladas se realizaron utilizando el sistema API20E (bioMérieux, France). En la Tabla 2 se muestran los patotipos control utilizados en este estudio.

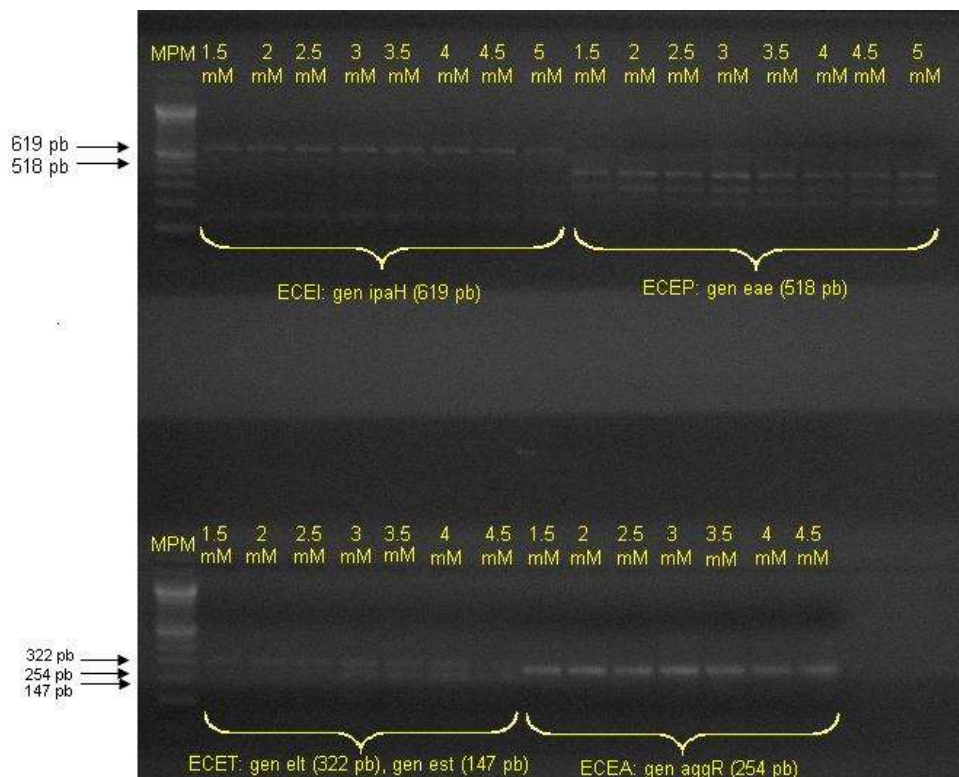
**Table 2.**  
***Escherichia coli* strains used as a positive control to standardize amplification protocols.**

**Tabla 2.**  
**Cepas de *Escherichia coli* utilizadas como control positivo para estandarizar los protocolos de amplificación.**

Pathotype	Amplified virulence factor	Serotype or identification code	Origin*
EHEC	<i>stx1, stx2, eaeA, hly<sub>933</sub></i>	O157:H7	ATCC 46597
EHEC	<i>stx1, stx2, eaeA, hly<sub>933</sub></i>	O157:H7	ATCC 43895
EPEC	<i>eaeA, hly<sub>933</sub></i>	O111	ATCC 43887
ETEC	<i>est, elt</i>	E9034A	Universidad Autónoma de Puebla
EPEC	<i>eaeA, hly<sub>933</sub></i>	E2348169	Universidad Autónoma de Puebla
EAEC	<i>aggR</i>	O42	Universidad Autónoma de Puebla
EIEC	<i>ipaH</i>	O28ac:H5	Universidad Autónoma de Puebla

\*Collection of the indicated institution.

\*Colección de la institución indicada.



**Figura 1. Amplificados de PCR multiplex de la cepas de referencia.**  
Curva de concentración de MgCl<sub>2</sub> para la optimización de la PCR.

**Figure 1. Amplifications of Multiplex PCR selected reference strains.**  
Curve of concentrations MgCl<sub>2</sub> for PCR optimization.

#### Determining pathotypes by PCR

The strains obtained by both methods of isolation and of a control strain of each pathotype were submitted to DNA extraction, using the protocol proposed by Feng & Monday (2000). The quality of the DNA was assessed through observation in an 1 % agarose gel, stained with ethidium bromide and the concentration was obtained through spectrophotometry. Likewise, the DNA/proteins ratio was determined, to assess its quality. Calibration curves of magnesium chloride were carried out for each of the three polymerase chain reactions (PCR) used in this study, using DNA from the control strains (Figure 1). The conditions and optimal components of each of them were shown on Table 3.

Suspect strains for *E. coli* obtained for both methods of the protocol proposed by the FDA (2011) were submitted to the PCR proposed by McDaniels *et al.*, (1996), for the

#### Determinación de patotipos por PCR

Las cepas recuperadas por ambas rutas de aislamiento y una cepa control de cada patotipo se sometieron a la extracción de DNA, empleando el protocolo propuesto por Feng y Monday (2000). Se evaluó la calidad del DNA por observación en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio y se obtuvo la concentración por espectrofotometría. Así mismo, se determinó la relación DNA/proteínas, para evaluar su calidad. Se realizaron curvas de calibración de cloruro de magnesio para cada una de las tres reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) que se utilizaron en este estudio, empleando DNA de las cepas control (Figura 1). En la Tabla 3, se muestran las condiciones y componentes óptimos para cada una de ellas.

Las cepas sospechosas para *E. coli* obtenidas por ambas rutas del protocolo propuesto por la FDA (2011), se sometieron a la PCR propuesta por McDaniels *et al.* (1996), para la detección del gen *gadA/B*, que codifica

**Tabla 3.**  
**Condiciones y componentes estandarizados para las reacciones de PCR.**

**Table 3.**  
**Standardized conditions and components for PCR reactions.**

Protocol stage and conditions	McDaniels <i>et al.</i> (1996)	Toma <i>et al.</i> (2003)	Fratamico <i>et al.</i> (2000)
Preheating	94 °C 1 min	94 °C 2 min	94 °C 1 min
Desnaturalización	94 °C 20 s	94 °C 20 s	58 °C 1 s
Alignment	55 °C 1 min	58 °C 1 min	55 °C 1 min
Extension	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min
Final extension	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 7 min
Components of the reaction mixture	Polymerase buffer 1.25X MgCl <sub>2</sub> 2.5 mM dNTPs mix 0.2 mM Of each primer Forward and Reverse <i>gadA/B</i> 0.5 mM Taq Polymerase 2.5 U	Polymerase buffer 1 X MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM dNTPs mix 0.2 mM Of each primer Forward and Reverse 0.5 mM AL 65 0.25 mM SK1 0.25 mM ipaIII 0.25 mM LTL 0.25 mM est 0.25 mM ipaH 0.25 mM aggR Taq Polymerase 2.5 U	Polymerase buffer 1X MgCl <sub>2</sub> 3.0 mM dNTPs mix 0.4 mM Of each primer Forward and Reverse 0.5 mM de <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>hly</i> <sub>933</sub> except 0.25 mM by <i>eaeA</i> Taq Polymerase 2.5 U
50 ng of DNA contained in:	5 µL	5 µL	5 µL
Reaction volume:	50 µL	50 µL	50 µL

\* Reactions were carried out in a Thermal Cycler (Techne®, Bibby Scientific Ltd, U.K.).

detection of *gadA/B* gene, which encodes for glutamate decarboxylase, which is used for the confirmation of *E. coli* (Figure 2). The *gadA/B* strains that resulted to be positive were identified by the protocol proposed by Toma *et al.* (2003), to identify genetic determinants attributed to EIEC, EPEC, ETEC, EHEC and EAEC. The procedure consists in the detection of PCR products specific for each pathotype, by means of a multiplex PCR. In the same way, the strains confirmed by the protocol of MacDaniels *et al.* (1996) were submitted to multiplex PCR for EHEC proposed by Fratamico *et al.* (2000); which allowed amplifying four virulence factors for this pathotype (Figure 3). The oligonucleotides used were shown on Table 4.

The five pathotypes were analyzed by comparing the sizes of the PCR products of the samples with those of the control strains.

para glutamato descarboxilasa, la cual se utiliza en la confirmación de *E. coli* (Figura 2). Las cepas *gadA/B* positivas se identificaron por el protocolo propuesto por Toma *et al.* (2003), para identificar determinantes genéticos propios de EIEC, EPEC, ETEC, EHEC y EAEC. El procedimiento consiste en la detección de productos de PCR específicos para cada patotipo, mediante una reacción de PCR multiplex. De igual forma, las cepas que fueron confirmadas por el protocolo de MacDaniels *et al.* (1996), se sometieron a PCR multiplex para EHEC propuesta por Fratamico *et al.* (2000); la cual permite amplificar cuatro factores de virulencia para este patotipo (Figura 3). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 4.

Los cinco patotipos se analizaron comparando los tamaños de los productos de PCR de las muestras con los de las cepas control.

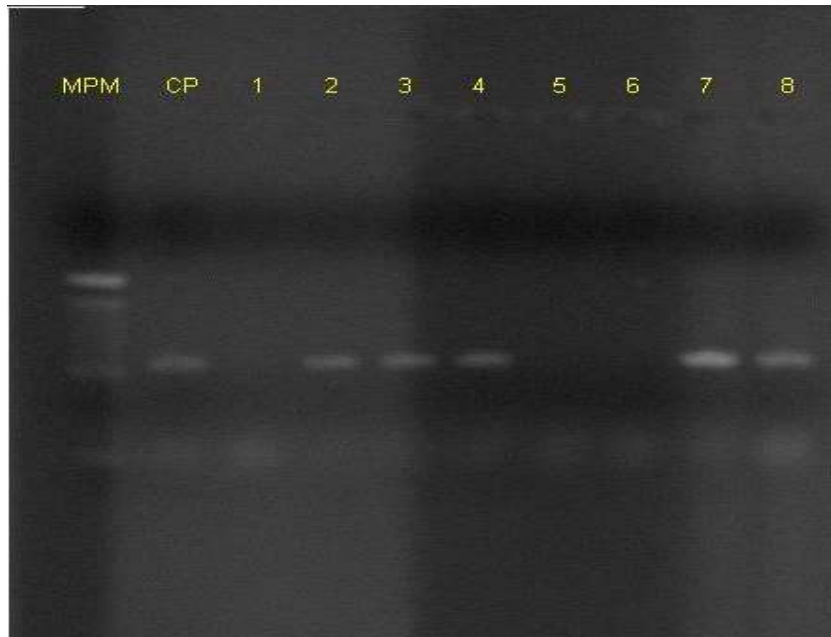


Figure 2. Representative gel showing multiplex PCR amplification of *gadA/B* in *Escherichia coli* enterotoxigenic (Positive Control, CP) and some strains (line 1 to 8).

Figura 2. Gel representativo que muestra la amplificación el gen *gadA/B* en *Escherichia coli* enteroxigénica (Control Positivo, CP) y algunas cepas (línea 1 a 8).

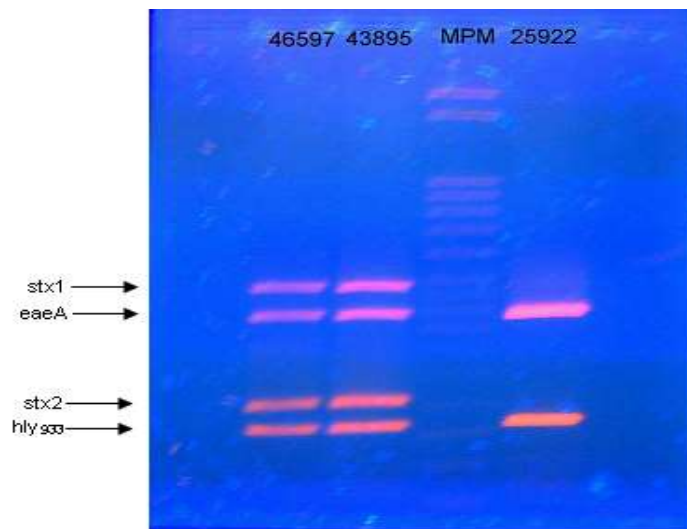


Figure 3. Gel showing multiplex PCR amplification of *Escherichia coli* enterohemorrhagic ATCC 46597, *Escherichia coli* enterohemorrhagic ATCC 43895 and, *Escherichia coli* enteropathogenic ATCC 25922.

Figura 3. Gel que muestra los aplicados de PCR para *Escherichia coli* enterohemorrhagica ATCC 46597, *Escherichia coli* enterohemorrhagica ATCC 43895 y *Escherichia coli* enterohemorrhagica ATCC 25922.

**Table 4.**  
**Oligonucleotides used in the protocols for PCR.**  
**Tabla 4.**  
**Oligonucleótidos utilizados en los protocolos para las PCR.**

Oligonucleotides	Sequence (5' to 3')	Target gene	Product size (bp)	Encoding protein	Genus and species or patotype that it detects	Source
gadAB F	ACCTGCGTTGCGTAAATA	gadA/B	670	Glutamate decarboxylase	E. coli	McDaniels <i>et al.</i> (1996)
gadAB R	GGGCGGGAGAAGTTGATG					
AL65	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	est	147	Thermostable enterotoxin	ETEC	Hornes <i>et al.</i> (1991)
AL125	CCTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC					
LT <sub>L</sub>	TCTCTATGTGCATACGGAGC	elt	322	Thermostable enterotoxin	ETEC	T a m a n a i - Shacoori <i>et al.</i> (1994)
LT <sub>R</sub>	CCATACTGATTGCCGCAAT					
ipaIII	GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	ipaH	619	H antigen invasion plasmid	EIEC	Sethabutr <i>et al.</i> (1993)
ipaIV	GCCGGTCAGCCACCTCTGAGAGTAC					
aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	AggR	254	Transcriptional activator for AAT / I expression	EAEC	Ratchtrachenchai <i>et al.</i> (1997)
aggRks2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC					
SLTI-F	TGTAACCTGAAAGGTGGAGTATACA	stx1	210	Shiga toxin Type 1	EHEC	Meng <i>et al.</i> (1997)
SLTI-R	GCTATTCTGAGTCAACGAAAATAAC					
SLTII-F	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	stx2	484	Shiga toxin Type 2	EHEC	Meng <i>et al.</i> (1997)
SLTII-R	GATGCATCTCGGTATTGTATTAC					
AE22	ATTACCATCCACACAGACGGT	eaeA	397	Intimate	E P E C , EHEC	Fratamico <i>et al.</i> (1995)
AE20-2	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT					
MFSI-F	ACGATGTGGTTATTCTGGA	hly <sub>933</sub>	166	Hemolysin (hlyA)	E P E C , EHEC	Fratamico & Strobaugh (1998)
MFSI-R	CTTCACGTCACCATACATAT					

## Results and Discussion

The 76 isolations were obtained from 15 of the 100 samples analyzed, from which 25 were isolated by means of the method for EHEC proposed by the FDA (2011) and 51 strains by the method for the other pathotypes.

A total of 55 strains (72.36 %) of the 76 isolated, amplified for the *gadA/B* gene, which were submitted to a multiplex PCR for detecting virulence factors for EHEC and the rest of *E. coli* pathotypes. It was found that 7.27 % (4/55) of the strains amplified the *aggR* gene of 254 pb, which encodes for the transcriptional activator of the expression of AAT/II of EAEC, and that 41.81 % (23/55) amplified for the *elt* gene of 322 pb that encodes for thermolabile enterotoxin of ETEC. No PCR products were identified for EPEC AND EIEC.

## Resultados y Discusión

Los 76 aislamientos se obtuvieron de 15 de las 100 muestras analizadas, de las cuales 25 fueron aisladas por el método para EHEC propuesto por la FDA (2011) y 51 cepas por el método para los otros patotipos.

Un total de 55 cepas (72.36 %) de las 76 aisladas, amplificaron para el gen *gadA/B*, las cuales fueron sometidas a PCR-multiplex para la detección de los factores de virulencia para EHEC y del resto de los patotipos de *E. coli*. Se encontró que el 7.27 % (4/55) de las cepas amplificaron para el gen *aggR* de 254 pb, que codifica para el activador transcripcional para la expresión de AAT/II de EAEC, y que el 41.81 % (23/55) amplificó el gen *elt* de 322 pb que codifica para enterotoxina termolábil de ETEC. No se identificaron productos de PCR para EPEC Y EIEC.



On the other hand, of the 55 strains of *E. coli* confirmed and approved by multiplex PCR for EHEC, none of them showed PCR products that encode for virulence factors for this pathotype.

In relation with the amplification of virulence factors for EHEC, the control strain used amplified for type 1 Shiga toxin and type 2 Shiga toxin (*stx2*). It is important to highlight that this protocol had already been approved by Varela-Hernández *et al.* (2007), finding that the optimal concentration for the amplification of these virulence factors is 3.0 mM of MgCl<sub>2</sub>.

Once a PCR analysis was realized for the different protocols of PCR for pathogenic *E. coli*, it was revised from which samples came the positive strains.

The results of frequency and virulence factors amplified for this pathotype were shown in Table 5.

After the association of the results of the identification of pathotypes in strains with respect to sampled months and samples analysis, the results were shown on Table 1. It is important to mention that at national level, there are only a few studies of this type. Fifteen percent (15/100) of the samples resulted to be positive for some *E. coli* pathotype, all of them were detected in the warm months in the city of Guadalajara, Jalisco, in agreement with Varela-Hernández *et al.* (2007) and Cagney *et al.* (2004), who reported a seasonal behavior, in researches on prevalence in minimally processed fresh beef, where they found that the probability to isolate EHEC was greater in spring-summer than in fall-winter.

se identificaron productos de PCR para EPEC y EIEC. Por otro lado, de las 55 cepas de *E. coli* confirmadas y que fueron probadas por la PCR-multiplex para EHEC ninguna mostró productos de PCR que codificaran para los factores de virulencia de este patotipo.

En relación con la amplificación de los factores de virulencia para EHEC, la cepa control utilizada amplificó para la toxina Shiga tipo 1 y toxina Shiga tipo 2 (*stx2*), cabe resaltar que este protocolo ya había sido probado por Varela-Hernández *et al.* (2007), encontrando que la concentración óptima para la amplificación de estos factores de virulencia es de 3.0 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Una vez realizado un análisis de la PCR por los diferentes protocolos de PCR para *E. coli* patógena, se revisó de que muestras provenían las cepas positivas.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de frecuencia y los factores de virulencia amplificados por patotipo.

La asociación de los resultados de la identificación de patotipos con respecto a los meses de recolección y análisis de las muestras, se muestran en la Tabla 1. Cabe mencionar que a nivel nacional existen pocos estudios de este tipo. El 15 % (15/100) de las muestras fueron positivas para algún patotipo de *E. coli*, todas ellas fueron detectadas en los meses cálidos en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, coincidentemente con Varela-Hernández *et al.* (2007) y Cagney *et al.* (2004), que reportaron un comportamiento estacional, en investigaciones de prevalencia en carne fresca mínimamente procesada de bovino, donde encontraron que la probabilidad de aislar EHEC era mayor en las estaciones primavera-verano que en otoño-invierno.

**Table 5.**  
**Frequency of samples from which *Escherichia coli* pathotypes and amplified genes were isolated.**

**Tabla 5.**  
**Frecuencia de muestras de las que se aislaron patotipos de *Escherichia coli* y los genes amplificados.**

Pathotype	Amount of positive samples	Number of positive strains/total strais (percentage)	Amplified virulence factor
EAEC	2	4/55 (7.27 %)	<i>aggR</i>
ETEC	13	23/55 (41.18 %)	<i>eit</i>
EIEC	0	0/55	-
EPEC	0	0/55	-
EHEC	0	0/55	-

Villaseca *et al.* (2005) described some outbreaks associated with pathogenic *E. coli* registered in hospitals from Central America countries, however, no reference was made to the infection vehicle of the patients. A higher frequency of patients infected by the pathogen was declared, who attend hospitals during the warm months (April to June), data coinciding with the frequency of *E. coli* pathotypes, according to the sampling month, found in this study.

Particularly in this zone of western Mexico, it coincided that in May, the highest annual average temperature was observed to be  $33 \pm 2.1$  °C, with the highest frequency of isolation of *E. coli* pathotypes (CLIMATE-DATA, 2019). This data is important to be considered since in the butcher's shops of the country, meat is exposed to the public at room temperature.

Barlow *et al.* (2006) collected 285 samples of ground beef in 10 occasions of 31 butcher's shops for one year in Australia; of which 16 % (46/285) were presumptive for EHEC by means of the method proposed by the FDA (2011), similar frequency to that found in the present study (15 %); although only one sample per shop was collected in this study. Barlow *et al.* (2006) isolated 63 STEC strains of which 5 % (3/63) encode for *stx1*, 55 % (35/63) for *stx2* and 65 % (41/63) for intimine, contrary to the present study in which of a total of 25 presumptive strains of EHEC, none of them amplified for any virulence factor, specifically for the approved ones.

On the other hand, Etcheverría *et al.* (2010) detected samples positive of STEC, between 12.34 % and 18.64 % in isolated samples of carcasses in sanitary control cabins of slaughterhouses in Argentina and 24.5 % in meat coming from butcher's shops; which contrasts with 15 % of the two pathotypes found in the present study. As well, Cagney *et al.* (2004), in the Republic of Ireland, in a study with similar characteristics to ours, found that from 140 samples of ground beef obtained from shops, none detected EHEC, which coincides with our results. In this context, it is necessary to implement hygiene measures and health programs that guarantee the innocuousness of the meat starting from its acquisition, transport and storing in the shop, that avoid or minimize crossed contamination and the growth of these microorganisms, not exempting the thermic elimination of the pathogen when cooking the meat.

Villaseca *et al.* (2005) describieron algunos brotes asociados con *E. coli* patogénica registrados en hospitales de países de Centroamérica, sin embargo, no se hizo referencia al vehículo de la infección de los pacientes, se declaró una mayor frecuencia de pacientes infectados por el patógeno, que ingresan a los hospitales durante los meses cálidos (abril a junio). Dato que coincide con la frecuencia de patotipos de *E. coli*, según mes de muestreo, encontrado en el presente estudio.

Particularmente en esta zona del occidente de México, coincidió que en el mes de mayo, se observó la mayor temperatura promedio anual que fue de  $33 \pm 2.1$ °C, con la mayor frecuencia de aislamiento de patotipos de *E. coli* (CLIMATE-DATA, 2019). Este dato es importante considerarlo debido a que en las carnicerías del país se expone la carne al público a temperatura ambiente.

Barlow *et al.* (2006) recolectaron 285 muestras de carne molida de bovino en 10 ocasiones de 31 carnicerías durante un año en Australia; de las cuales el 16 % (46/285) fueron presuntivas para EHEC mediante la utilización del método FDA (2011), frecuencia similar a la encontrada en el presente estudio (15 %); aunque en este estudio se colectó una sola muestra por expendio. Barlow *et al.* (2006) aislaron 63 cepas STEC de las cuales el 5 % (3/63) codificaron para *stx1*, 55 % (35/63) para *stx2* y el 65 % (41/63) para intimina, en contraste con el presente estudio en el que de un total de 25 cepas presuntivas de EHEC, ninguna amplificó para algún factor de virulencia en específico de los probados.

Por otro lado, Etcheverría *et al.* (2010) detectaron positividad de STEC, de entre el 12.34 % y 18.64 % en muestras aisladas de canales en cabinas de control sanitario de rastros de Argentina y 24.5 % en carne proveniente de carnicerías; lo que contrasta con el 15 % de los dos patotipos encontrados en el presente estudio. Así mismo, Cagney *et al.* (2004), en la República de Irlanda, en un estudio con similares características al nuestro encontraron que en 140 muestras de carne molida obtenida de expendios, no detectaron EHEC, lo que coincide con nuestros resultados. En este contexto, es necesario implementar medidas de higiene y programas de sanidad que garanticen la inocuidad de la carne desde su obtención, su transporte y almacenamiento en el expendio, que eviten o minimicen la contaminación cruzada y el crecimiento de estos microorganismos, no eximiendo la eliminación térmica del patógeno durante la cocción del alimento.

## Conclusion

There was evidence that 15 % of ground beef sold in butcher's shops in Guadalajara, Jalisco was contaminated by pathogenic *Escherichia coli*, involving a potential risk for consumers.

## Conclusión

Existe evidencia que el 15 % de la carne molida de bovino que se expende en carnicerías de Guadalajara, Jalisco se encuentra contaminada por *Escherichia coli* patógena, lo que implica un riesgo potencial para los consumidores.

## References

- Barham, A. R., Barham, B. L., Johnson, A. K., Allen, D. M., Blanton, J. R., Jr. and Miller M. F. (2002). Effects of the transportation of beef cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. *J Food Prot.* 65(2):280-283. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.2.280>
- Barlow, R. S., Gobius, K. S. and Desmarchelier, P. M. (2006). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: results of a one-year study. *Int J Food Microbiol.* 111(1):1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.039>
- Cagney, C., Crowley, H., Duffy, G., Sheridan, J., O'Brien, S., Carney, E., Anderson, W., McDowell, D., Blair, I. and Bishop, R. (2004). Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157: H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. *Food Microbiol.* 21(2):203-212. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00052-2)
- Center for disease Control and prevention [CDC]. (1994). Foodborne outbreaks of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. [Última consulta: Diciembre de 2019]: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00025017.htm>.
- CLIMATE-DATA. (2019). Average temperature Guadalajara. <https://en.climate-data.org/north-america/mexico/jalisco/guadalajara-6337/> [Last Checked: June 2019].
- Etcheverría, A. I., Padola, N. L., Sanz, M. E., Polifroni, R., Kruger, A., Passucci, J., Rodriguez, 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 Sci.* 86(2):418-421. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.027>
- FDA. (2011). Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>. [Last Checked: March 2018].
- Feng, P. & Monday, S. R. (2000). Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Mol Cell Probes.* 14(6):333-337. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2000.0323>
- Flores, I. D., Niño-Serna, L. F. and Beltrán-Aroyave, C. P. (2020). Acute Infections Diarrhea and Gastroenteritis in Children. *Curr Infect Dis Rep.* 22 (4): 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11908-020-0713-6>
- Fratamico, P. & Strobaugh, T. (1998). Simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157: H7 by multiplex PCR. *J Ind Microbiol and Biotechnol.* 21(3):92-98. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900520>
- Fratamico, P. M., Bagi, L. K. and Pepe, T. (2000). A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feces. *J Food Prot.* 63(8):1032-1037. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.8.1032>
- Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M. and Deng, M. Y. (1995). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 33(8):2188-2191. <https://jcm.asm.org/content/jcm/33/8/2188.full.pdf>
- Hornes, E., Wasteson, Y. and Olsvik, Ø. (1991). Detection of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin genes in pig stool specimens by an immobilized, colorimetric, nested polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology.* 29(11):2375-2379. <https://jcm.asm.org/content/jcm/29/11/2375.full.pdf>
- INEGI. (2018). Índice Nacional de Precios al Consumidor-Primera Quincena de Enero del 2018. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/inpc\\_1q/inpc\\_1q2018\\_01.pdf](http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/inpc_1q/inpc_1q2018_01.pdf) [Last Checked: March 2018].
- Kiranmayi, C., Krishnaiah, N. and Mallika, E. N. (2010). *Escherichia coli* O157: H7-An Emerging Pathogen in foods of Animal Origin. *Veterinary World.* 3(8):382-389. [https://www.researchgate.net/profile/Bindu\\_Kiranmayi/publication/49607679\\_Escherichia\\_coli\\_O157H7\\_\\_An\\_Emerging\\_Pathogen\\_in\\_foods\\_of\\_Animal\\_Origin/](https://www.researchgate.net/profile/Bindu_Kiranmayi/publication/49607679_Escherichia_coli_O157H7__An_Emerging_Pathogen_in_foods_of_Animal_Origin/)

- links/578df53f08ae81b4466eb05e/Escherichia-coli-O157H7-An-Emerging-Pathogen-in-foods-of-Animal-Origin.pdf
- Karmali, M. A., Gannon, V. and Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 140(3-4):360-370. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- McDaniels, A. E., Rice, E. W., Reyes, A. L., Johnson, C. H., Haugland, R. A. and Stelma, G. N. Jr. (1996). Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Appl Environ Microbiol.* 62(9):3350-3354. <https://aem.asm.org/content/aem/62/9/3350.full.pdf>
- Meng, J., Zhao, S., Doyle, M. P., Mitchell, S. E. and Kresovich, S. (1997). A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol.* 24(3):172-176. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00375.x>
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O. and Caprioli, A. (2000). Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun.* 68(1):64-71. <https://doi.org/10.1128/iai.68.1.64-71.2000>
- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M. and Swerdlow, D. L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.* 11 (4):603-609. <https://doi.org/10.3201/eid1104.040739>
- Ratchtrachenchai, O. A., Subpasu, S. and Ito, K. (1997). Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR. *Bull Dept Med Sci.* 39(4):211-220. [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_nih/a\\_nih\\_5\\_001c.asp?info\\_id=249](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_5_001c.asp?info_id=249)
- Sethabutr, O., Venkatesan, M., Murphy, G. S., Eampokalap, B., Hoge, C. W. and Echeverria, P. (1993). Detection of Shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *Journal of Infectious Diseases.* 167(2):458-461. <https://doi.org/10.1093/infdis/167.2.458>
- Sperandio, V. & Nguyen, Y. 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2:90. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00090>
- Stanley, P. L., Winslow, T. A. and Pillay, I. (2017). Detection of Presumptive Pathogens in Ground Beef from Supermarket and Farmers' Market Sources. *Georgia Journal of Science.* 75(2):2. <http://digitalcommons.gaacademy.org/cgi/viewcontent.cgi?article=1031&context=gjs>
- Surendran-Nair M. (2017). Controlling Enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7 using Selenium and Rutin. Doctoral Dissertations. 1552:1. <https://opencommons.uconn.edu/dissertations/1552/> [Last Checked: December 2019].
- Thakur, N., Jain, S., Changotra, H., Shrivastava, R., Kumar, Y., Grover, N. and Vashist, J. (2018). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes: Association of virulent genes, serogroups, and antibiotic resistance among moderate-to-severe diarrhea patients. *J Clin Lab Anal.* 32(5):e22388. <https://doi.org/10.1002/jcla.22388>
- Tamanai-Shacoori, Z., Jolivet-Gougeon, A., Pommepuy, M., Cormier, M. and Colwell, R. R. (1994). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water by polymerase chain reaction amplification and hybridization. *Can J Microbiol.* 40(4):243-249. <https://doi.org/10.1139/m94-040>
- Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M. and Iwanaga, M. (2003). Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 41(6):2669-2671. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2669-2671.2003>
- Varela-Hernández, J., Cabrera-Díaz, E., Cardona-López, M., Ibarra-Velázquez, L., Rangel-Villalobos, H., Castillo, A., Torres-Vitela, M. and Ramírez-Álvarez, A. (2007). Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. *International journal of food microbiology.* 113(2):237-241. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.028>
- Villaseca, J. M., Hernandez, U., Sainz-Espunes, T. R., Rosario, C. and Eslava, C. (2005). Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. *Rev Latinoam Microbiol.* 47(3-4):140-159. [https://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2005/mi05-3\\_4j.pdf](https://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2005/mi05-3_4j.pdf)