




UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria

**Determinación de *Escherichia coli* O157:H7 en carne molida,
Hamburguesas y Salame de la Ciudad de Valdivia**

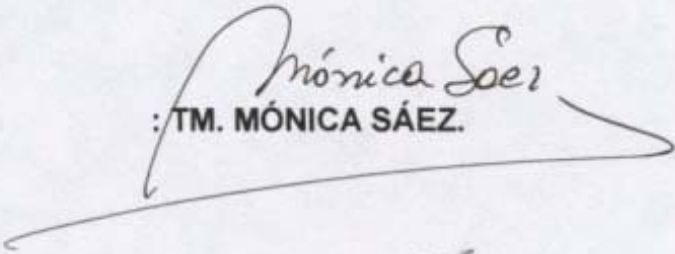
Tesis de Grado presentada como parte de los
requisitos para optar al Grado de **LICENCIADO EN
MEDICINA VETERINARIA.**

Pilar Alejandra Mancilla Castillo
Valdivia Chile 1999


PROFESOR PATROCINANTE

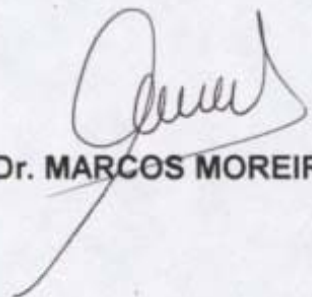

: Dr. RAFAEL TAMAYO.

PROFESOR COLABORADOR


: TM. MÓNICA SÁEZ.

PROFESORES CALIFICADORES


: Dra. CARMEN GALLO.


: Dr. MARCOS MOREIRA

FECHA DE APROBACIÓN

:9 DE DICIEMBRE DE 1999.

***A mis adorados padres
y queridos hermanos.***

INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	9
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSIÓN	19
7. BIBLIOGRAFÍA	25
AGRADECIMIENTOS	31

1. RESUMEN

"DETERMINACIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 EN CARNE MOLIDA, HAMBURGUESAS Y SALAME DE LA CIUDAD DE VALDIVIA"

Este estudio se realizó con el fin de determinar la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carne molida, hamburguesas y salame, causante de Colitis Hemorrágica (CH) y consecuente Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en niños y ancianos principalmente. Para esto, se analizaron 70 muestras de carne molida obtenidas desde 14 carnicerías, 10 muestras de hamburguesas desde siete supermercados y 10 muestras de salame desde dos fábricas de cecinas de la ciudad de Valdivia. El muestreo se realizó desde julio de 1998 hasta marzo de 1999.

En la técnica diagnóstica se utilizó durante la etapa de enriquecimiento caldo EC suplementado con novobiocina 50 mg/l (EC-n). El agar MacConkey sorbitol suplementado con cefixima 0,05 mg/l y telurito de potasio 2,5 mg/l (AMCS-CT), para la diferenciación de colonias sorbitol negativas. En la obtención de colonias glucoronidasas negativas se utilizó el agar TSA suplementado con MUG 50 mg/l y simultáneamente se determinó la reacción de Indol. Como pruebas complementarias, las colonias fueron sometidas en forma simultánea a Tinción de Gram y como pruebas bioquímicas TSI y Citrato. Para la confirmación de colonias se utilizó serología con el antisuero O157.

De las muestras de carne molida, 80% tuvieron colonias sorbitol negativas así como el 78,5% de muestras de hamburguesas y el 10% de muestras de salame. 23 muestras de carne molida y una de hamburguesas, resultaron sospechosas a MUG e Indol. De las pruebas bioquímicas y tinción de Gram, sólo dos muestras de carne molida de la misma carnicería fueron sospechosas para la serología al ser los únicos bacilos Gram negativos. No se produjo aglutinación en la serología.

Este resultado es cercano a la realidad nacional, donde no son frecuentes los aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 tanto de muestras de alimentos como de muestras clínicas de pacientes con diarrea.

En conclusión, no se determinó la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en ninguna de las muestras analizadas en este trabajo y son necesarios más estudios con estos y otros alimentos implicados en diarreas por esta bacteria.

Palabras claves: *Escherichia coli*, enterohemorrágica, serotipo O157:H7, productos cárneos, microbiología alimentos.

2. SUMMARY

"DETERMINATION OF *Escherichia coli* O157:H7 IN MINCED BEEF, HAMBURGERS AND SALAMI OF THE CITY OF VALDIVIA"

In order to determine the presence of *E. coli* O157:H7, in minced beef, hamburgers and salami, 70 minced beef samples from 14 butcherys, 10 hamburgers samples from seven supermarkets and 10 salami samples from two beef manufacturing plants of the city of Valdivia were analyzed. The sampling was made from July 1998 until march 1999.

The diagnostic technique used during the enrichment step was EC broth with novobiocin 50mg/l (EC-n). In order to differentiate the sorbitol negative colonies the sorbitol MacConkey agar with cefixime 0.05 mg/l and tellurite 2.5 mg/l (SMAC-CT) was used. To obtain the glucuronidase negatives colonies the TSA agar with 4-methylumbelliferol-B-D-glucuronidase (MUG) 50 mg/l was used and simultaneously the Indol reaction was determinated. As a complementary test, the colonies were tested by Gram stain, TSI and Citrate probes. The confirmation was performed with antiserum O157.

Of the total of minced beef samples, 80% were sorbitol negative, as well as 78.5% of the hamburgers and the 10% of salami samples. Twenty three samples of minced beef and one hamburger were suspicious to MUG and Indol. Of the biochemical probes and Gram stain only 2 samples of minced beef of the same butchery were suspicious, because they were Gram negative rods. Finally, there was no agglutination in the serology.

This result seems close from the national reality, where it is not frecuent to isolat *E. coli* O157:H7 from food and patients with diarrhea stools.

It can be concluded that the presence of *E. coli* O157:H7 was not determinated in any of the samples analyzed.

Key words: *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic, serotype O157:H7, meat products, food microbiology.

3. INTRODUCCION

3.1. ANTECEDENTES GENERALES.

El crecimiento sostenido de la población mundial ha llevado consigo un aumento en la demanda por los alimentos. Esto ha promovido la utilización de tecnologías como instrumentos de control de la calidad de los mismos, y así contribuir a proteger la salud humana (Mangarías, 1985).

Por el estilo de vida actual como consecuencia al crecimiento poblacional, el hombre ha tratado de solucionar problemas cotidianos relacionados con la mejor utilización de su tiempo, recurriendo a lugares de comida rápida o facilitándose las labores en la casa con la utilización de productos cárneos congelados de rápida preparación. Por esta razón, han surgido problemas de salud directamente relacionados con los alimentos y sus métodos de preparación, siendo principales responsables la contaminación de éstos por tóxicos, bacterias, hongos y toxinas. Las bacterias son las mayores causantes de estas enfermedades, sobre todo las agrupadas en la familia de las Enterobacterias (Fusté, 1998).

3.2. ENTEROBACTERIAS

El numeroso y heterogéneo grupo de bacterias Gram negativas que constituye la familia de las Enterobacterias se encuentra ampliamente distribuido en la tierra y en las plantas, siendo además colonos normales de los tractos intestinales de los seres humanos y animales. Los géneros más importantes que conforman esta familia son: ***Escherichia***, ***Shigella***, ***Edwardsiella***, ***Salmonella***, ***Klebsiella***, ***Yersinia***, entre otros (Krieg y Holt, 1984).

El género ***Escherichia*** está compuesto por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles o inmóviles, de tamaño entre 0,3-1,0 x 1,0-0,6 μm , fermentan la glucosa produciendo gas, son indol positivo, oxidasa negativo, citrato negativo, catalasa positivo, reducen nitratos a nitritos, fermentan el manitol, son positivas a la β -glucoronidasa usando el sustrato 4-metilumbeliferol- β -D-glucorónido (MUG) y descarboxilan la usina (Krieg y Holt, 1984; Holt y col., 1994).

Dentro de este género se encuentra la especie ***Escherichia coli***. Su hábitat natural es el tracto intestinal del hombre y animales. Su presencia en alimento indica contaminación de origen fecal, razón por la cual es usado como el indicador clásico

de la posible presencia de patógenos entéricos en agua, leche y otros productos (International Commission Microbiological Specifications in Foods, 1978).

En general la presencia de un gran número de Enterobacterias y *Escherichia coli* indica:

- 1.- Inadecuado proceso y/o recontaminación posterior al proceso, generalmente de las materias primas crudas, equipo sucio o manipulación con higiene insuficiente.
- 2.- Proliferación microbiana, lo cual permitiría encontrar una amplia variedad de organismos patógenos y toxigénicos (ICMSF, 1978).

La clasificación serológica de *Escherichia coli* se basa en los tres grupos principales de antígenos: lipopolisacárido somático O, antígeno capsular K y antígeno flagelar H. Su composición antigénica es compleja, con más de 170 antígenos O, 56 antígenos H y numerosos antígenos K (Jawetz y col., 1996).

Escherichia coli es la causa más frecuente de algunas de las infecciones bacterianas más comunes, como la de las vías urinarias, meningitis neonatal, infecciones respiratorias y gastroenteritis (Eisentein y col, 1993). Las cepas que producen gastroenteritis se han dividido en cinco grupos: Enterotoxigénicas (ECET), Enteroinvasivas (ECEI), Enteropatógenicas (ECEP), Enterohemorrágicas (ECEH) y Enteroagregativas (ECEagg) (Jawetz y col., 1996).

Las cepas Enterohemorrágicas (ECEH) producen una citotoxina denominada verotoxina o Shiga like, que tiene la capacidad de alterar las células de manera progresiva e irreversible (Jawetz y col., 1996). Dentro del grupo de *E. coli* enterohemorrágicas existen numerosos serotipos causantes de enteritis y otras complicaciones tales como el **O26:H11; O11:H⁻; O145:H⁻ ; O45:H2; O128:H⁻, O4:H⁻ ; O103:H2; O157:H⁻ y O157:H7** siendo este último el que causa las patologías más frecuentes y más graves (Margall y col., 1997).

La clasificación serológica de los aislamientos se basa en la utilización de antisueros específicos, lo que indica que aproximadamente un 80% de las cepas de ECEH pertenecen al serotipo **O157:H7** (Jawetz y col., 1996).

3.3. ESCHERICHIA COLI O157:H7

3.3.1. Características bioquímicas

Dentro de las características bioquímicas diferenciales de *Escherichia coli* **O157-H7** se encuentran las siguientes: no fermenta el sorbitol en 24 horas, no posee

capacidad glucoronidasa, y no crece a temperaturas de 44-45,5°C (Cullor, 1995). Es capaz de crecer en ambientes muy ácidos (pH 2,5 a 3,0), multiplicarse a temperaturas tan bajas como 7°C y mantenerse viable durante meses en carne congelada a -20°C (Blanco y col., 1996a).

3.3.2. Distribución geográfica

Desde que en 1982 se produjeran dos brotes de diarrea en Estados Unidos, y se identificara como causante a ***Escherichia coli O157:H7*** (Riley y col., 1983), esta bacteria ha continuado provocando gran número de brotes de Colitis Hemorrágica, la mayoría de los cuales se han producido en Estados Unidos, Canadá, Reino Unido y Japón (Blanco y col., 1996a; Simmons, 1997).

El número de aislamientos de ***Escherichia coli O157:H7*** desde muestras fecales en Inglaterra y Gales, se ha incrementado desde uno en 1982 a 470 en 1992; en Escocia de tres en 1984 a 242 en 1994 (Simmons, 1997).

En Estados Unidos, un estudio realizado para determinar la incidencia de esta bacteria en la población afectada con infecciones entéricas, de 6.485 muestras fecales analizadas, en 25 se identificó a ***Escherichia coli O157:H7***, resultando una tasa de incidencia de 8 en 100.000 personas al año (MacDonald y col., 1988). En este mismo país, y con el incremento de pruebas e informes de laboratorios, los registros de brotes aumentaron de 2 por año de 1982 a 1992, a 17 en 1993 y 25 hasta octubre de 1994. Hasta el año 1995, 26 estados reportaban infecciones con ***Escherichia coli O157:H7*** (Cullor, 1995). Los últimos datos del año 1996, indican que en Estados Unidos ocurren al año del orden de 10.000 a 20.000 casos de infección por ***Escherichia coli O157:H7*** (Blanco y col., 1996a).

Diversas publicaciones señalan que las pérdidas económicas en países como Estados Unidos son del orden de 216 a 580 millones de dólares anuales, por costos de tratamientos médicos y descenso de la productividad por los afectados (Blanco y col., 1996a).

En Canadá, donde la mayoría de los laboratorios realizan el diagnóstico rutinario de este patógeno, se registra la mayor incidencia de infección con 1.342 casos que fueron identificados y oficialmente registrados en 1987, correspondiendo a 5,2 por cada 100.000 habitantes (Blanco y col., 1996,3).

Los principales brotes ocasionados en Japón, abarcaron las ciudades de Hiroshima, Oakayama y Sakai durante 1996 y Yokohama y Gamagori en 1997. El mayor brote se registró en la ciudad de Sakai, lugar donde se enfermaron más de 5000 personas y seis murieron (OPS-OMS, 1996; Itoh y col., 1998.)

3.3.3. Vías de transmisión

La transmisión de este patógeno ocurre principalmente a través del consumo de ciertos alimentos. La comida de origen animal como carne molida insuficientemente cocida (Cullor, 1995) y la leche no pasteurizada contaminada con fecas, son probablemente la mayor vía de infección para el hombre (Heuvelink y col., 1996; Wang y col., 1997)). Durante el sacrificio y especialmente durante el desollé y evisceración, la carne se puede contaminar con cepas de *E. coli* presentes en el intestino que toman contacto con la canal (Blanco y col., 1996b). Además de lo anterior, se han visto involucrados otros alimentos, el agua no clorada, agua de lago, sidra de manzana, vegetales, mayonesa, yoghurt, crema ácida, mantequilla, salame dentro de los productos embutidos fermentados, carne de cangrejo y la carne de pollo (Cullor, 1995; Hinkens y col., 1996; OPS-OMS, 1996; Reinhard y col., 1996; Hara-Kudo y col., 1997; Dineen y col., 1998; Food Safety Inspection Service, 1998).

Otra forma de transmisión a considerar es el contacto persona-persona, debido al contacto directo fecal-oral, causante de varios brotes de diarrea por *Escherichia coli* O157:H7 en establecimientos con alto grado de hacinamiento, como jardines infantiles, hogares de ancianos y escuelas de deficientes mentales (Carter y col., 1987; Griffin y Tauxe, 1991).

Sin embargo, la hamburguesa sigue siendo el primer vehículo y el más importante identificado para la transmisión de *Escherichia coli* O157:H7 (Reitsma y Henning, 1995). En relación a esto, a finales de 1992 y principios de 1993, se produjo un gran brote de infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 en Washington y otros estados de Estados Unidos, en los cuales el alimento involucrado fue hamburguesa mal cocida, servida en múltiples locales de una cadena de restaurantes de comida rápida (Tarr y col., 1997).

Al estar la carne vinculada en la transmisión de *Escherichia coli* O157:H7, se han realizado estudios que indican que el ganado bovino es el principal reservorio de *Escherichia coli* O157:H7 (MacDonald y col., 1988), especialmente el ganado lechero joven (Wang y col., 1996).

No obstante, este tipo de cepa no es exclusiva de los bovinos y se ha encontrado con relativa frecuencia en la flora intestinal del ganado ovino (Blanco y col., 1996a) y de las aves de corral (Conner, 1992).

En nuestro país, en un estudio realizado en bovinos aparentemente sanos, se identificó un 28,7% de portadores de ECEH en su contenido intestinal, de los cuales un porcentaje del 10% correspondió a *Escherichia coli* O157:H7. El estudio concluyó que los bovinos adultos faenados en la Región Metropolitana constituyen un reservorio de cepas ECEH patógenas para el hombre (Monreal, 1996).

3.3.4. Cuadro Clínico

***Escherichia coli* O157:H7** es reconocida en todo el mundo como un peligroso patógeno humano que causa Colitis Hemorrágica (CH) y es capaz de producir complicaciones crónicas en algunos individuos (Erickson y col., 1995).

La dosis infectante mínima es baja (Griffin y Tauxe, 1991), se estima entre 10^2 y 10^3 bacterias por gramo de alimento (Margall y col., 1997).

El mecanismo de acción de ***E. coli* O157:H7** consiste en la adhesión a los enterocitos, logrando borrar las microvellosidades de estas células, para lo cual posee un plasmido que codifica una fimbria que actúa como adhesina inicial. La secuencia del proceso patogénico según los conocimientos actuales sería: adherencia laxa al enterocito por la fimbria, seguida de adherencia íntima y lesión de la pared del enterocito por producción de la proteína "intimina" codificada por el gen *eae* y posterior liberación de verotoxina (Margall y col., 1997; Tarr y col., 1997).

La presentación clínica más frecuente de la CH, se caracteriza por un cuadro grave de dolor abdominal y diarrea sanguinolenta. Los vómitos suelen producirse en la mitad de los pacientes y la fiebre sólo en una tercera parte (Riley y col., 1983). Aproximadamente el 10% de los afectados por CH termina desarrollando Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), que afecta fundamentalmente a niños y tiene una tasa de mortalidad que oscila entre 5 y 10%. Se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal aguda (Blanco y col., 1996a).

En el hospital nacional de niños de Costa Rica, durante el año 1996, fueron registrados cuatro casos de niños menores de dos años con SUH (OPS-OMS, 1996).

En Sudamérica, Argentina posee una alta frecuencia de SUH, con 300 casos por año. El riesgo de SUH en niños de 6 a 48 meses de edad es de aproximadamente 22 en 100.000 habitantes en Buenos Aires (López y col., 1997).

En Chile, la incidencia de SUH es de 3-4 por cada 100.000 niños al año (Prado y col., 1995). De estos niños, la mitad requiere diálisis, el 3-5% muere y entre el 20-30% queda con secuelas (Prado, 1996). Se ha establecido cierta estacionalidad de presentación de SUH debido a que el 64% de los casos ocurren en los meses de primavera y verano (octubre a marzo). La edad de los afectados con SUH es en promedio 16,8 meses (rango 4-33 meses) (Prado y col., 1995).

3.3.5. Diagnóstico

Los métodos convencionales para la detección de *Escherichia coli* O157:H7, consisten en el aislamiento de colonias y la posterior confirmación mediante pruebas serológicas y bioquímicas (Deng y Fratamico, 1996).

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), recomienda para el método de aislamiento y confirmación de esta bacteria en carne, una etapa de enriquecimiento, seguida por 24 horas de aislamiento selectivo y ensayos de confirmación de 24 a 48 horas (Restaino y col., 1996).

Los medios de cultivos favorecen su aislamiento, al aprovechar las características bioquímicas diferenciales de esta bacteria, desde muestras de alimentos y muestras clínicas de pacientes con diarrea. Son utilizados, entre otros el caldo EC para enriquecimiento, el agar MacConkey sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio (que inhiben el crecimiento de otras bacterias sorbitol negativas), el uso de MUG para medir la actividad glucoronidasa y la confirmación mediante la aglutinación con los antisueros O157 y H7 (Cullor, 1995; Blanco y col., 1996a; Heuvelink y col., 1997), entre otros.

Cabe agregar, que el diagnóstico por métodos convencionales como el descrito anteriormente es lento, se han desarrollado otras técnicas de diagnóstico sensibles y rápidas, como la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), Elisa, Inmunofluorescencia, Inmunolectroscopía, Cultivo de células, Hibridación del DNA, etc. (Frías y col., 1996; Johnson y col., 1996; Itoh y col., 1998; Johnson y col., 1998).

El objetivo de este estudio fue determinar si existía la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carne molida de carnicerías, hamburguesas en venta en supermercados y salame de la industria cecinera de la ciudad de Valdivia.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL

Un total de 94 muestras de carne molida, hamburguesas y salame fueron obtenidas por el Servicio de Salud de Valdivia desde 14 carnicerías, siete supermercados y dos fábricas de cecinas de la ciudad de Valdivia durante los meses de julio de 1998 y marzo de 1999, de las cuales 70 muestras correspondieron a carne molida, 14 de hamburguesas y 10 de salame.

De cada carnicería y fábrica de cecinas se obtuvieron 5 muestras; de los supermercados A-B-C-E-F, 2 muestras de hamburguesas y de los supermercados D-G, 3 y 1 muestra de hamburguesas respectivamente.

La fecha de los muestreos se indican a continuación:

06 de julio de 1999: Carnicería 1

13 de julio de 1998: Fábrica de cecinas 1

Supermercado 1: Hamburguesas Paty y Beaf

20 de julio de 1998: Supermercado 2: Hamburguesas Procarne y PF

23 de julio de 1998: Carnicería 2 y Carnicería 3

27 de julio de 1998: Carnicería 4

30 de julio de 1998: Carnicería 5

11 de agosto de 1998: Supermercado 3: Hamburguesas PF y Beaf

20 de agosto de 1998: Supermercado 4: Hamburguesas Paty, Procarne y Beaf

01 de septiembre de 1998: Carnicería 6

04 de septiembre de 1998: Carnicería 7

09 de septiembre de 1998: Fábrica de cecinas 2

16 de septiembre de 1998: Supermercado 5: Hamburguesas Procarne y PF

05 de octubre de 1998: Carnicería 8

03 de noviembre de 1998: Carnicería 9

12 de noviembre de 1998: Carnicería 10

20 de noviembre de 1998: Carnicería 11 y Carnicería 12

25 de noviembre de 1998: Carnicería 13 y Carnicería 14

01 de marzo de 1999: Supermercado 6: Hamburguesas San Jorge y Procarne

Supermercado 7: Hamburguesa Biffesor

El material de laboratorio utilizado consistió en:

- ❖ Material de vidrio básico de laboratorio de microbiología.
- ❖ Multi - mixer® (Lab. Line instrument, Designer and manufacturers. Melrose park. ill.)
- ❖ Caldo EC (1) suplementado con novobiocina (2) en concentración de 50 mg/l. de medio.
- ❖ Agar MacConkey sorbitol (3) suplementado con cefixima (2) en concentración de 0,05 mg/l de medio y telurito de potasio (2) en concentración de 2,5 mg/l de medio
- ❖ Agar Trypticase de soya (TSA) (4).
- ❖ Sustrato de 4-metilumbeliferol-S-D-glucorónido (MUG) (4) a concentración de 50 mg/l de medio en agar TSA.
- ❖ Lámpara de ultravioleta con una longitud de onda de 366 nm.
- ❖ Agua peptonada y reactivo de Kovacs para reacción de Indol.
- ❖ Agar Citrato de Simmons (4) y agar Hierro tres azúcares (Triple Sugar Iron Agar - TSI) (4), para las pruebas bioquímicas.
- ❖ Reactivos para inción de Gram.
- ❖ Agar Plate count(PC)(1)
- ❖ Suero fisiológico al 0,85%.
- ❖ Antisueros **O157** y **H7** (3).

(1) Laboratorios MERCK.

(2) Laboratorios SIGMA.

(3) Laboratorios DIFCO.

(4) Laboratorios OXOID.

4.2. METODOS

Todas las muestras fueron obtenidas desde locales inspeccionados según calendario de muestreo que elabora para este fin el Departamento de Programas del Ambiente del Servicio de Salud de Valdivia, de manera aséptica, utilizando material esterilizado como guantes de goma, mascarillas, gorro y delantal, siendo guardadas y rotuladas en bolsas plásticas estériles y transportadas en cajas isotérmicas a temperatura de refrigeración al laboratorio de Microbiología del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Universidad Austral de Chile, para ser sometidas a análisis dentro de un tiempo máximo de 24 horas.

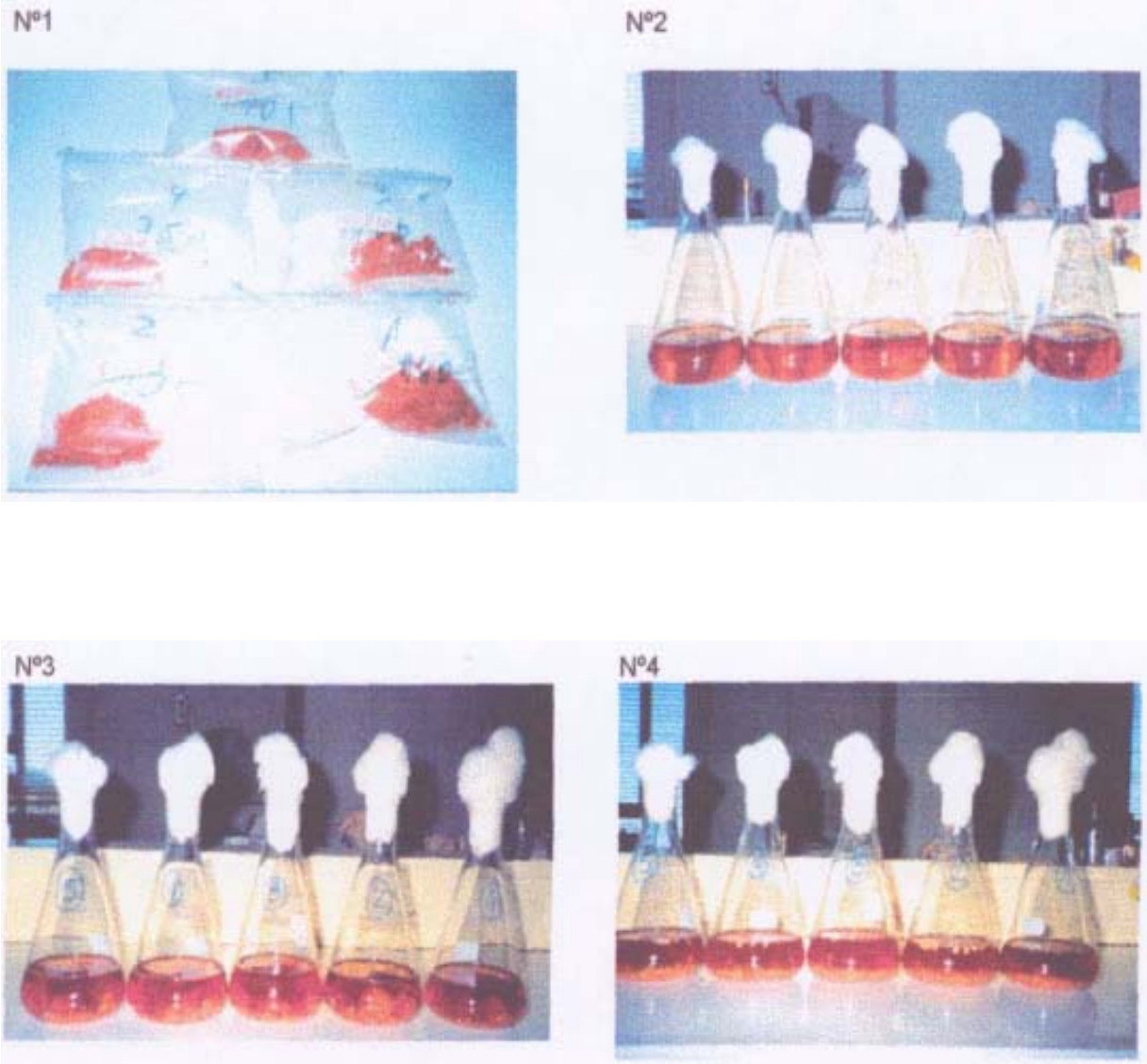
4.2.1. Procedimiento

Para la determinación de *Escherichia coli* 0157: H7, todas las muestras se sometieron a la siguiente metodología de análisis recomendados por Food and Drug Administration-Bacteriological Analytical Methods, 1995; Blanco y col., 1996b y Hara-Kudo y col., 1997:

- a) Se pesaron porciones de 25 g de cada muestra que se colocaron en 225 ml de caldo EC (en matraces Erlenmeyer) suplementado con novobiocina, homogenizando los contenidos de los matraces en un agitador de cuatro brazos por un tiempo de 10 minutos y posteriormente incubados a 35-37°C por 16 a 18 horas.
- b) De la etapa anterior se estriaron con un asa una gota del caldo de enriquecimiento a placas de agar MacConkey sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio, dejándolas incubar por 24-48 horas a 35-37°C.
- c) Las colonias sospechosas de *E. coli* O157:H7 aparecieron neutras o grises con un punto oscuro en el centro. De éstas se escogieron dos colonias y se pasaron cada una con un asa a tubos con agua peptonada para reacción de Indol; de cada tubo de agua peptonada se estrió en placas de agar TSA suplementado con sustrato de MUG, se incubaron a 35-37°C por 24-48 horas. Luego de este tiempo las placas fueron observadas bajo la lámpara de ultravioleta con una longitud de onda de 366 nm; reconociendo a las colonias sospechosas de *E. coli* O157:H7 por no presentar fluorescencia. A los tubos de agua peptonada se les agregó unas gotas de reactivo de Kovacs, resultando positiva la reacción con la formación de un anillo fucsia en el tubo.
- d) Las colonias sospechosas, es decir MUG negativas e Indol positivas, se sometieron simultáneamente a tinción de Gram y pruebas bioquímicas tales como TSI y Citrato de Simmons. Las cepas que se presentaron como bacilos Gram (-), fermentadores de glucosa, fermentadores o no de lactosa (Holt y

col., 1994) y/o sacarosa, sin formación de H₂S y que no utilizaron el citrato como única fuente de carbono, se sembraron en tubos de ceparios con agar PC inclinado y se incubaron a 35-37°C por 24-48 h, para ser almacenadas a temperatura de refrigeración.

- e) De los tubos de cepario, se sembraron las cepas en estudio en placas de agar PC para la obtención de cultivos frescos y ser confirmadas mediante serología, para lo cual se confrontó en una placa de vidrio una gota de antisuero **O157** con una asada de colonia sospechosa y otra con una gota de suero fisiológico mezclando hasta obtener una suspensión homogénea. Se considera positiva la reacción al producirse aglutinación dentro de 2 minutos en el antisuero **O157** y no en el suero fisiológico.



Fotografías 1-4: muestras de carne molida, matraces con 225 ml de caldo EC, 25 g de muestra en los 225 ml de caldo EC suplementado con novobiocina, muestras en matraces posterior a la agitación de 10 m.



Fotografías 5-9: material de microbiología, balanza y agitador de cuatro brazos, medios de cultivo, lámpara de Ultravioleta, reactivos Indol y Tinción de Gram.

5. RESULTADOS

No se determinó la presencia de *E coli* O157: H7 en ninguna de las 94 muestras analizadas en este estudio.

Los resultados obtenidos en las diferentes etapas de la metodología de detección y de acuerdo a los criterios de selección utilizados se presentan a continuación.

Cuadro 1. Colonias sospechosas sorbitol negativas de muestras de carne molida, hamburguesas y salame obtenidas desde agar McConkey sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio.

Locales Muestreados	Número de muestras	N° de muestras con colonias sorbitol negativas
Carnicería A	5	5
Carnicería B	5	5
Carnicería C	5	5
Carnicería D	5	5
Carnicería E	5	4
Carnicería F	5	5
Carnicería G	5	0
Carnicería H	5	5
Carnicería I	5	5
Carnicería J	5	5
Carnicería K	5	2
Carnicería L	5	0
Carnicería M	5	5
Carnicería N	5	5
Total	70(100%)	56(80%)
Supermercado A	2	2
Supermercado B	2	2
Supermercado C	2	2
Supermercado D	3	1
Supermercado E	2	2
Supermercado F	2	1
Supermercado G	1	1
Total	14(100%)	11(78.5%)
Fábrica de cecinas A	5	0
Fábrica de cecinas B	5	1
Total	10(100%)	1(10%)

Del total inicial de catorce carnicerías maestreadas, siete (50%) resultaron tener muestras sospechosas a MUG e Indol. Del total de siete supermercados, uno resultó tener una muestra sospechosa a MUG e Indol.

Cuadro 2. Número de muestras de carne molida y hamburguesas sospechosas a MUG e INDOL

Locales Muestreados	Nº de muestras con colonias sospechosas a MUG e Indol
Carnicería B	4
Carnicería C	2
Carnicería D	3
Carnicería H	5
Carnicería I	2
Carnicería J	4
Carnicería N	3
Total	23(32.85%)
Supermercado E	1
Total	1(7,14%)

Cuadro 3. Comportamiento de las muestras sospechosas a MUG e INDOL frente a pruebas bioquímicas.

Locales Muestreados	Hiero tres azúcares (TSI)			Citrato de Simmons
	Glucosa	Lactosa	H ₂ O	
Carnicería B	Δ	K	-	-
	A	A	-	-
	A	K	-	-
	A	A	-	-
Carnicería C	A	K	-	-
	A	A	-	-
Carnicería D	A	K	-	-
	A	K	-	-
	A	A	-	-
Carnicería H	A	K	-	-
	A	K	-	-
	A	K	-	-
	A	A	-	-
Carnicería I	A	K	-	-
	K	K	-	+
Carnicería J	K	K	-	+
	A	K	-	-
	A	K	-	-
	A	K	-	-
Carnicería N	A	K	-	-
	A	A	+	-
	A	K	-	-
Supermercado E.	A	K	-	-
	A	K	-	+

A: Acido

k: Alcalino

+: Positivo

-: Negativo

Del Cuadro 3 se destaca que solamente las colonias de la carnicería "I" no fermentaron la glucosa y utilizaron el citrato. Una colonia de la carnicería "N" produjo H₂S y otra del supermercado "E" utilizó el citrato.

Cuadro 4. Morfología de las colonias a la Tinción de Gram de muestras sospechosas a MUG e Indol.

Locales maestreados	Tinción de Gram
Carnicería B	Coco G- Coco G- Coco G- Coco G-
Carnicería C	Coco G- Coco G-
Carnicería D	Coco G- Coco G+ Coco G-
Carnicería H	Coco G- Coco G+ Coco G+ Coco G- Coco G -
Carnicería 1	Coco G- Coco G-
Carnicería J	Coco G- Bacilo G- Coco G- Bacilo G-
Carnicería N	Coco G- Coco G- Coco G-
Supermercado E	Coco G-

G-: Gram negativo

G+: Gram positivo

En relación al Cuadro 4 se puede destacar, que de la totalidad de colonias sospechosas tanto de muestras de carne molida y hamburguesas, sólo 2 pertenecientes a la carnicería "J" correspondieron a bacilos Gram negativos.

Los resultados de los Cuadros 3 y 4 se utilizaron como criterio de selección final de colonias sospechosas. Por lo tanto, las dos colonias de las muestras de la carnicería "J" que resultaron ser bacilos Gram negativos y que bioquímicamente presentaron características de ***E. coli***, fueron sometidas a serología.

Finalmente, no se produjo aglutinación al confrontarlas con el antisuero 0157, siendo ambas muestras negativas a la presencia de ***E. coli* O157: H7**.

6. DISCUSION

Diversas investigaciones epidemiológicas demuestran que los alimentos elegidos para este estudio (carne molida, hamburguesa y salame), se han visto involucrados en brotes de diarrea debido a la presencia de *E. coli* O157:H7 (Riley y col., 1983; Margall y col., 1997; FSIS, 1998). Sin embargo, en este trabajo no se determinó la presencia de *E. coli* O157:H7 en las muestras analizadas.

Es limitado el número de estudios en los cuales se ha tratado de determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 en productos cárneos. En una investigación realizada en Canadá, se recuperó *E. coli* O157:H7 en seis (3,7%) de 64 muestras de carne molida, cuatro (1,5%) de 264 muestras de carne de cerdo, cuatro (1,5%) de 263 muestras de pollo y cuatro (2,0%) de 205 muestras de cordero (Doyle y Schoeni, 1987). En España, se recuperó esta bacteria en tres (9%) de 33 muestras de carne molida, y ninguna desde 25 muestras de hamburguesas (Blanco y col., 1996b). En Nueva Zelanda, se determinó la presencia de *E. coli* O157:H7 en una (0,13%) de 770 muestras mezcladas de carne molida y carne de cerdo, y ninguna desde 1000 muestras de carne molida, 260 de cerdo y 300 muestras de carne de pollo (Heuvelink y col., 1996). Por último, en un reciente estudio realizado en Santiago de Chile, no se aisló *E. coli* O157:H7 desde 279 muestras de hamburguesas analizadas (Droppelmann y col., 1999).

Los aislados de *E. coli* O157:H7 en las muestras de los tres estudios de Canadá, España y Nueva Zelanda mencionados previamente, han sido inferiores a lo esperado por sus investigadores, debido a que esta bacteria es comunmente aislada desde pacientes con diarrea en esos países (Doyle y Schoeni, 1987; Blanco y col., 1996a; Heuvelink y col., 1996).

Pareciera que el resultado del presente estudio no resulta muy lejano a la realidad de nuestro país, en el cual son escasos los estudios realizados y el diagnóstico de *E. coli* O157:H7 no es habitual desde pacientes con diarrea. En la ciudad de Valdivia existe un solo antecedente de un aislado de esta bacteria desde un paciente con diarrea el año 1998¹.

Es preciso considerar que el resultado obtenido en este estudio pudo estar influenciado por: 1) elección de muestras analizadas, 2) método empleado para la detección de la bacteria.

¹ Comunicación personal, Dra. Rita Mansilla, Departamento Programas del Ambiente, Servicio de Salud de Valdivia.

6.1. ELECCIÓN DE MUESTRAS ANALIZADAS.

Para este estudio, las muestras fueron escogidas por ser de fácil obtención y el número se limitó a los materiales disponibles para el diagnóstico en el laboratorio. La elección de estas muestras concuerda con estudios similares, los cuales investigadores han probado técnicas para la detección y supervivencia de ***E. coli O157:H7*** bajo diferentes condiciones (Doyle y Schoeni, 1987; Blanco y col., 1996b; Johnson y col., 1998; Rocelle y col., 1998; Sage e Ingham, 1998).

6.2. MÉTODO DE DETECCIÓN.

Las técnicas de cultivo para el diagnóstico de ***E. coli O157:H7*** utilizadas en este estudio como en otros anteriores, son similares para el análisis de muestras de alimentos, fecas y de agua (Hara-Kudo y col., 1997; Kudva y col., 1998; Rocelle y col., 1998).

6.2.1. Etapa de enriquecimiento.

El medio utilizado para la etapa de enriquecimiento en este estudio fue el caldo EC suplementado con novobiocina. Este medio ha sido utilizado por varios autores (Johnson y col., 1995; Blais y col., 1997a; Heuvelink y col., 1997; Dineen y col., 1998), obteniendo todos ellos resultados positivos en la recuperación de esta bacteria. Por otra parte, otros investigadores han utilizado otro medio de enriquecimiento como el caldo Trypticase de soya (Harrison y col., 1998; Kudva y col., 1998), que al compararlo con el caldo EC, entrega densidades menores de bacterias (Blais y col., 1997a), lo que sugiere que este caldo, aunque facilita la disponibilidad de ***E. coli O157:H7***, puede tener un efecto adverso en la célula luego de cierto tiempo de incubación (Heuvelink y col., 1997).

Otros factores considerados en la etapa de enriquecimiento fueron la temperatura de incubación y la agitación. Al respecto, en este estudio se incubó a 35-37°C con agitación previa de diez minutos. En algunos estudios, sus autores recomiendan agitación constante e incubación a 42°C (Blais y col., 1997b; Hara-Kudo y col., 1997). Estas diferencias en temperaturas no debieran ser determinantes en el aislamiento de esta bacteria, debido a que con otros medios de cultivo, autores han utilizado temperaturas de 44°C manteniéndose viable esta bacteria (Entis y Lerner, 1997; Sage e Ingham, 1998).

6.2.2. Primer medio selectivo diferencial.

En el presente estudio, se utilizó el agar MacConkey sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio. Este agar ha sido utilizado suplementado con estos compuestos como medio diferencial de *E. coli* O157:H7 por varios autores siendo eficaz como medio de aislamiento selectivo (Blanco y col., 1996b; Hara-Kudo y col., 1997; Heuvelink y col., 1997; Radu y col., 1998). Otros autores también lo han utilizado sin suplementación (Conner, 1992; Entis y Lerner, 1997; Rocelle y col., 1998; Woody y col., 1998). En un estudio en el cual se comparó el uso del agar MacConkey (AMCS), suplementado sólo con cefixima (AMCS-C) y suplementado con cefixima y telurito de potasio (AMCS-CT), para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 desde fecas bovinas inoculadas directamente, desde fecas de ganado lechero colonizado naturalmente, y desde fecas de terneros inoculados en forma oral, se concluyó que AMCS-CT es el más sensible como medio en placa (Sanderson y col., 1995).

Además, se han utilizado para este fin, otros medios como el agar Rojo fenol sorbitol con 1% de ácido pirúvico, o el agar Levine modificado eosina azul de metileno (Ahmed y Conner, 1995; Rocelle y col., 1998), pero en general, se considera el agar MacConkey sorbitol, como el que otorga mejores resultados (Heuvelink y col., 1997).

El alto número de muestras sorbitol negativas obtenidas (Cuadro 1), podría deberse a la existencia de otras bacterias que no fermentan el sorbitol como *Proteus* spp. ; *Erwinia* sp. y otras *E. coli* (Holt y col., 1994, Heuvelink y col., 1997), que pueden haber sido resistentes a la cefixima y el telurito de potasio.

6.2.3. Segundo medio diferencial.

El segundo medio utilizado en el presente estudio, fue el agar TSA suplementado con MUG. En cuanto al MUG, no existen cuestionamientos y es utilizado por varios autores suplementando diferentes medios como el agar MacConkey sorbitol y el agar Rojo fenol sorbitol (Ahmed y Conner, 1995; Huang y Chang, 1996; Wang y col., 1997).

También se utiliza como suplemento el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronidasa (BCIG). Utilizando cualquiera de los dos compuestos, se buscan las colonias β -glucuronidasas negativas (Johnson y col., 1995; Huang y Chang, 1996; Heuvelink y col., 1997; Kudva y col., 1998; Rocelle y col., 1998). Se asume de los estudios previamente citados, que el uso del MUG en el agar MacConkey sorbitol, se basa en la economía de tiempo, ya que de esta manera se obtienen dos características diferenciales de una vez.

Si bien, el uso del MUG es para diferenciar *Escherichia coli* atípicas de *E. coli* O157:H7 (FDA-BAM, 1995), también existen otras bacterias, como *S. aureus* (Holt y col., 1994), que como *E. coli* O157:H7 no posee capacidad glucoronidasa y que podría llegar hasta esta etapa, como se muestra en el Cuadro 2.

En cuanto a los Cuadros 3 y 4, las bacterias que llegaron hasta estas etapas, es decir, bacterias fermentadoras de glucosa, fermentadoras o no de lactosa, productoras o no de H₂S, utilizadoras o no de citrato como fuente de carbono, cocos Gram (+) o (-) y bacilos Gram (-), corresponderían a otras como *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Pediococcus*, *Flavobacterium*, *Acromobacterium*, *Clostridium* entre otras que son frecuentemente aisladas desde la carne y que corresponden a un variado grupo de bacterias, tanto Gram negativas como positivas (Frazier, 1972; Schmidt- Hebbel, 1984).

Al existir informes de la presencia de *E. coli* O157:H7 en el ganado bovino, por el aislamiento de esta bacteria en las fecas de animales en estudios de países como Chile y Estados Unidos, se asume que la carne y productos cárneos podrían poseer esta bacteria (Monreal, 1996; Hancock y col., 1997), lo que no concuerda con el resultado de las muestras de los productos analizados.

La tendencia mundial para asegurar la calidad de los productos, incluidos los alimentos, ha hecho posible que se establezcan diferentes medidas para disminuir el riesgo de enfermar por la ingestión de ellos. Es así que la educación mediante campañas, aumentan los cuidados del público para evitar las enfermedades (Dargatz y col., 1997).

Es conocido que *E. coli* O157:H7 no es resistente al calor, por lo tanto, ha sido necesario adecuar prácticas que disminuyan la importancia de este patógeno en los alimentos, llegando a determinar que se elimina fácilmente cocinando los alimentos hasta que alcancen una temperatura mínima de cocción de 68,3°C, para inactivar el 99,9% de las bacterias (Rocelle y col., 1998; Goodridge y col., 1999).

El establecimiento de programas, de Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos (HACCP) en las plantas faenadoras de carne y locales de comercialización de los productos cárneos, considerando los pasos de producción, proceso, distribución, venta y preparación de alimentos (Buchanan y Whitting, 1998), sin lugar a dudas, han contribuido a la disminución de la presencia de éste y otros patógenos en los alimentos de diferentes orígenes.

Finalmente, la situación actual de Chile frente a ***E. coli* O157:H7** puede ser similar a lo que comentaron investigadores españoles (Blanco y col., 1996a), quienes señalaban en 1996 que en ese país el bajo número de infecciones humanas en relación al potencial reservorio existente estaría relacionado con:

- 1) el porcentaje de animales colonizados en las explotaciones ganaderas sea reducido en comparación con otros países;
- 2) el proceso de los alimentos y los hábitos culinarios facilitan su inactivación;
- 3) que se haya estado en contacto con esta bacteria desde hace generaciones y la población ya se encuentre inmunizada.

6.3. CONCLUSIONES

De este estudio se puede concluir que:

- No se determinó la presencia de ***E. coli* O157:H7** en las 94 muestras analizadas de carne molida, hamburguesas y salame.
- Este resultado no indica que la bacteria no se encuentre en otros productos cárneos.
- Es necesario la realización de más estudios, considerando además otros alimentos con alto riesgo de contaminación bacteriana

7. BIBLIOGRAFIA

AHMED, N., E.D CONNER. 1995. Evaluation of various media for recovery of thermally-injured ***Escherichia coli* O157:H7**, *J. Food Prot.* 58(4):357-360.

BLAIS, B., R. BOOTH, L PHILLIPPE, S. PANDIAN, H. YAMAZAKI. 1997a. Polymacron™ Enzyme Immunoassay System for detection of ***Escherichia coli* O157** inoculated into foods, *J. Food Prot.* 60(2):98-101.

BLAIS, B., R. BOOTH, L. PHILLIPPE, H. YAMAZAKI. 1997b. Effect of temperature and agitation on enrichment of ***Escherichia coli* O157:H7** in ground beef using modified EC broth with novobiocin, *Inter. J. Food Microbiol.* 36:221-225.

BLANCO J., M. BLANCO, J.E. BLANCO, A. MORA, M. RÍO, C. PRADO, L. FERNÁNDEZ, M.P. ALONSO, A. RODRÍGUEZ. 1996a. Un nuevo enteropatógeno cuya presencia en la carne de vacuno supone un grave riesgo para la salud pública. Problemática en España. *EUR. J. Epidemiol.* 12:13-19.

BLANCO, J.E., M. BLANCO, A. MORA, C. PRADO, M. RÍO, L. FERNÁNDEZ, J. FERNÁNDEZ, V. SÁINZ, J. BLANCO. 1996b. Detection of enterohaemorrhagic ***Escherichia coli* O157:H7** in minced beef using immunomagnetic separation, *Microbiología SEM* 12:97-110.

BUCHANAN, R.L., R. WHITTING. 1998. RISK Assessment: A means for linking HACCP plans and public health, *J. Food Prot.* 61 (11): 1531-1534.

CARTER, A., A.A. BORCZYK, J.A.K. CARLSON, B. HARVEY, J.C. HOCKIN, M.A. KARMALI, C. KRISHNAN, D. KORN, H. LIOR. 1987. A severe outbreak of ***Escherichia coli* O157:H7** -associated hemorrhagic colitis in a nursing home, *N. Engl. J. Med.* 317(10):1496-1500.

CONNER, D.E. 1992. Temperature and Nacl affect growth and survival of ***Escherichia coli* O157:H7** in poultry-based and laboratory media, *J. Food Sci.* 57:532-533.

CULLOR, J.S. 1995. FOOD ANIMAL PRACTICE "***Escherichia coli* O157:H7**: The silent danger", *Vet. Med.* / January . pp 74-82.

DARGATZ, D., S.J. WELLS, LA. THOMAS, D. HANCOCK, L. GARBER. 1997. Factors Associated with the Presence of ***Escherichia coli* O157** in Feces of Feedlot Cattle, *J. Food Prot.* 60(5):466-470.

DENG, M.Y., P.M. FRATAMICO. 1996. A Multiplex PCR for rapid identification of shiga-like toxin-producing ***Escherichia coli* O157:H7** isolated from foods, *J. Food Prot.* 59(6): 570-576.

DINEEN, S.S., K. TAKEUCHI, J.E. SOUDAH, K.J. BOOR. 1998. Persistence of ***Escherichia coli* O157:H7** in dairy fermentation systems, *J. Food Prot.* 61(12):1602-1608.

DOYLE, M.P., J.L. SCHOENI. 1987. Isolation of ***Escherichia coli* O157:H7** from retail fresh meats and poultry, *Appl. Environ. Microbiol.* 53(10):2394-2396.

DROPPELMANN, A., M. ALEXANDRE, M.C. MARTINEZ. 1999. Detección de ***Escherichia coli*** Enterohemorrágica en muestras de hamburguesas por PCR. En: XXI CONGRESO CHILENO DE MICROBIOLOGÍA "DR. JANIS GRINBERGS M.", Valdivia, Chile, pp 84.

EISENTEIN, B., M. SCHAECHTER, G. MEDOSE. 1993. Mechanisms of microbial disease. 2^a ed. Baltimore: Williams and Wilkins. pp 635-678.

ENTIS, P., I. LERNER. 1997. 24-hour presumptive enumeration of ***Escherichia coli* O157** in foods by using the ISO-GRID® method with SD-39 Agar, *J. Food Prot.* 60(8):883-890.

ERICKSON, J.P., J. STAMER, M. MAYES, D.N. MCKENNA, L. VAN ALSTINE. 1995. An assessment of ***Escherichia coli* O157:H7** contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressings, *J. Food Prot.* 58(10): 1059-1064.

FDA-BAM. Bacteriológica! Analytical Manual. 1995 8th Edition. AOAC INTERNATIONAL. Cap. N°4.

FOOD SAFETY and INSPECTION SERVICE (FSIS). 1998. Venetian meat and salami company recalls Canadian dry sausage for ***E. coli* O157:H7**. Consumer Education and Information, United States Department of Agriculture, Washington, D.C.
Internet: <http://www.oanet.ksu.edu/foodsafety/factsheets&reports.htm/micrtdbn.pdf>.

FRAZIER, W.C. 1972. Microbiología de los alimentos. 2^a Edición Editorial Acribia Cap. 16 pp:251-279.

FRÍAS, C., M. MAJÓ, N. MARGALL, T. LLOBET, B. MIRELIS, G. PRATS. 1996. Evaluation of an enzyme immunoassay for verotoxin detection in ***Escherichia coli***.
Internet: <http://morgat.udg.es/microbsem/v1203-96/frias.html>.

FUSTE, OLGA. 1998. Cuidado y manejo de los alimentos en el hogar. Cooperative Extension Washington State University.

Internet: <http://coopext.cahe.wsu.edu/infopub/eb1785/eb1785.html>.

GOODRIDGE, L, J. CHEN, M. GRIFFITHS. 1999. Development and characterization of a fluorescent-bacteriophage assay for detection of ***Escherichia coli* O157:H7**, *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4): 1397-1404.

GRIFFIN, P., R. TAUXE. 1991. The epidemiology of infections caused by ***Escherichia coli* O157**, other enterohemorrhagic *E. coli* , and the associated Hemolytic Uremic Syndrome, *Epidemiol. Rev.* 13:60-91.

HANCOCK, D., D. RICE, L.A. THOMAS, D. DARGATZ, T. BESSER. 1997. Epidemiology of ***Escherichia coli* O157** in feedlot cattle, *J. Food Prot.* 60(5):462-465.

HARA-KUDO, Y., H. KONUMA, M. IWAKI, F. KASUGA, Y. SUGITA-KONISHI, Y. ITO, S. KUMAGAI. 1997. Potential hazard of radish sprouts as a vehicle of ***Escherichia coli* O157:H7**, *J. Food Prot.* 60 (9):1125-1127.

HARRISON, J., M. HARRISON, R.A. ROSE. 1998. Survival of ***Escherichia coli* O157:H7** in ground beef jerky assessed on two plating media, *J. Food Prot.* 61(1):11-13.

HEUVELINK, A., K. WERNARS, E. DE BOER. 1996. Occurrence of ***Escherichia coli* O157** and other verocytotoxin-producing *E. Coli* in retail raw meats in the Netherlands, *J. Food Prot.* 59 (12): 1267-1272.

HEUVELINK, A., J. ZWARTKRUIS-NAHUIS, E. DE BOER. 1997. Evaluation of media and kits for the detection and isolation of ***Escherichia coli* O157:H7** from minced beef, *J. Food Prot.* 60(7):817-824

HINKENS, J., N. FAITH, T. LORANG, P. BAILEY, D. BUEGE, C. KASPAR, J. LUCHANSKY. 1996. Validation of pepperoni processes for control of ***Escherichia coli* O157:H7**, *J. Food Prot.* 59 (12): 1260-1266.

HOLT, J.G., N.R. KRIEG, P.H.A. SNEATH, J.T. STANLEY, S.T. WILLIAMS. 1994. Bergey's manual of determinative Bacteriology. Group 5 Facultatively anaerobic Gram negative rods. 9^a ed. Williams & Wilkins. Baltimore. USA. pp. 179-180.

HUANG, S., T. CHANG. 1996. Specific Identification of ***Escherichia coli* O157** by an Immunostick Method Using Commercially Available Antibodies, *J. Food Prot.* 59(6):670-674.

INTERNATIONAL COMMISSION MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS IN FOODS-ICMSF. 1978. Microorganisms in Foods 1. Their significance and methods of enumeration. 2^a ed. Toronto, Canadá, pp. 1-15.

ITOH, Y., Y. SUGITA-KONISHI, F. KASUGA, M. IWAKI, Y. HARA-KUDO, N. SAITO, Y. NOGUCHI, H. KONUMA, S. KUMAGAI. 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* **O157:H7** present in radish sprouts, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4): 1532-1535.

JAWETZ, E., J. MELNICK, E. ADELBERG. 1996. Microbiología médica 15^a ed. Editorial El manual moderno. México, pp. 249-264.

JOHNSON, J.L., B.E. ROSE, A.K. SHARAR, G.M. RANSOM, C.P. LATTUADA, A.M. McNAMARA A.M. 1995. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* **O157:H7** associated with a food-borne disease outbreak, *J. Food Prot.* 58(6): 597-603.

JOHNSON, R.G., R.C. CLARKE, J.B. WILSON, S.C. READ, K. RAHN, S.A. RENWICK, K.A. SANDHU, D. ALVES, M.A. KARMALL, H. LIOR, S.A. McEWEN, J.S. SPIKA, C.L. GYLES. 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-**O157:H7** serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*, *J. Food Prot.* 59(10): 1112-1122.

JONHSON, J.L., C. BROOKE, S.J. FRITSCHER. 1998. Comparison of the BAX for screening/*E. coli* O157:H7 Method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* **O157:H7** in ground beef, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11):4390-4395.

KRIEG, N.R., J.G. HOLT. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Facultatively anaerobic Gram negative rods, Williams & Wilkins. Baltimore, USA pp 408-423.

KUDVA, I., K. BLANCH, C. HOVDE. 1998. Analysis of *Escherichia coli* **O157:H7** survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9): 3166-3174.

LÓPEZ, EL, M.M. CONTRINI, M. SANZ, M.R. VIÑAS, A. PARMA, M.F. DE ROSA, T.G. CLEARY. 1997. Perspectives on shiga-like toxin infections in Argentina, *J. Food Prot.* 60(11):1458-1462.

MACDONALD, K., M. O'LEARY, M. COHÉN, P. NORRIS, J. WELLS, E. NOLL, J. KOBAYASHI, P. BLAKE. 1988. *Escherichia coli* **O157:H7**, an emerging gastrointestinal pathogen, *JAMA* 259(24):3567-3570.

MANGANAS, M. 1985. "Perspectivas mundiales a largo plazo". La seguridad alimentaria mundial: algunos temas y problemas. Estudio FAO desarrollo económico y social. 53. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.

MARGALL, N., A. DOMÍNGUEZ, G. PRATS, L. SALIERAS. 1997 ***Escherichia coli*** Enterohemorrágica. Internet: <http://www.msc.es/revistas/resD/19905/indiceingl.html>.

MONREAL, Z. 1996. Detección y caracterización de *E. coli* enterohemorrágica en el contenido fecal de bovinos aparentemente sanos. Tesis M.V., Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Santiago, Chile.

OPS-OMS. 1996. Diarreas por ***Escherichia coli***. Internet: <http://200.943.24/interes/diarrea.htm>.

PRADO, V., J. CORDERO, C. GARREAUD, H. OLGUÍN, C. ARELLANO, C. NACHAR, A. MISRAJI, J. MARTÍNEZ, M. TOUS, M. RIVAS, M. LEVINE. 1995. *Escherichia coli* enterohemorrágica en el síndrome hemolítico urémico, en niños chilenos, *Rev. Méd. Chile* (123): 13-22.

PRADO, V. 1996. "Editorial: Enfermedades infecciosas emergentes: ¿un problema nuevo?", *Rev. Méd. Chile* (124):7-10.

RADU, S., S.A. MUTALIB, G. RUSUL, Z. AHMAD, T. MORIGAKI, N. ASAI, Y. BUKIM, J. OKUDA, M. NISHIBUCHI. 1998. Detection of ***Escherichia coli* O157:H7** in the beef marketed in Malaysia, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3): 1153-1156.

REINHARD, R., T.J. MCADAM, G. FLICK, R.E. CROONENBERGHS, R. WITTMAN, A. DIALLO, C. FERNANDES. 1996. Analysis of ***Campilobacter jejuni***, ***Campylobacter coli*** ***Salmonella***, ***Klebsiela pneumoniae***, and ***Escherichia coli* O157:H7** in fresh hand-picked blue crab (*Callinectes sapidus*) meat, *J. Food Prot.* 59(8):803-807.

REITSMA, C.J., D.R. HENNING. 1995. Survival of enterohemorrhagic ***Escherichia coli* O157:H7** during the manufacture and curing of cheddar cheese, *J. Food Prot.* 59(5):460-464.

RESTAINO, L., H.J. CASTILLO, D. STEWART, M.L. TORTORELLO. 1996. Antibody-direct epifluorescent filter technique and immunomagnetic separation for 10-h screening and 24-h confirmation of ***Escherichia coli* O157:H7** in beef, *J. Food Prot.* 59(10): 1072-1075.

RILEY, L, R. REMIS, S. HELGERSON, H. MCGEE, J. WELLS, B. DAVIS, R. HEBERT, E. OLCOTT, L. JOHNSON, N. HARGRETT, P. BLAKE, M. COHÉN. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype, *N. Engl. J. Med.* 308(12):681-685.

ROCELLE, M., S. CLAVERO, L. BEUCHAT, M. DOYLE. 1998. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from ground beef and bovine feces, and suitability of media for enumeration, *J. Food Prot.* 61(3):285-289.

SAGE, J.R., S. INGHAM. 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing in ground beef patties, *Journal of Food Prot.* 61(9):1181-1183.

SANDERSON, M.W., J.M. GAY, D.D. HANCOCK, C.C. GAY, L.K. FOX, T.E. BESSER. 1995. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces, *J. Clin. Microbiol.* 33:2616-2619.

SCHMIDT-HEBBEL, H. 1984. Carne y productos cárnicos: su tecnología y análisis. Editorial Universitaria pp 23-28.

SIMMONS, N. 1997 Global perspectives on *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxic *E. coli* ssp.: UKviews, *J. Food Prot.* 60(11): 1463-1465.

TARR, P., T. BESSER, D. HANCOCK, W. KEENE, M. GOLDOFT. 1997. verotoxigenic *Escherichia coli* infection: U.S. overview, *J. Food Prot.* 60(11): 1466-1471.

WANG,G., T. ZHAO, M.P. DOYLE. 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in bovine feces, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (7):2567-2570.

WANG,G., T. ZHAO, M.P. DOYLE. 1997. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk, *J. Food Prot.* 60(6):610-613.

WOODY, J-M., J.A. STEVENSON, R. WILSON, S. KNABEL. 1998. Comparison of the Difco EZ Coli™ Test Kit-HEC for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh Ground Beef, *J. Food Prot.* 61(1): 110-112

AGRADECIMIENTOS

En el siguiente listado señalo a todas las personas que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo y a las cuales quiero agradecer:

Dr. Rafael Tamayo, Profesor Patrocinante, por las indicaciones y tiempo dedicado para llevar a término este trabajo.

Srta. Mónica Sáez, por ser la primera persona en enseñarme el afán del laboratorio, por la paciencia y el tiempo dedicado, que muchas veces se acompañaron de cafecitos.

Las señoras: Viviana, por la buena voluntad, por prestarme el computador y buen ánimo siempre. Irma y Bernarda, por ayudarme con los materiales y ser buenas conversadoras.

Dra. Erika Gesche, por sus consejos y que como directora del Instituto nos consideró para pasar gratos momentos en él.

Claudia Hernández, por gentilmente leer esta tesis e indicarme errores de escritura, y además por ser buena amiga.

Al Departamento de Programas del Ambiente del Servicio de Salud de Valdivia, en especial a la Dra. Rita Mansilla, al Dr. Luis Barría, a las srtas. Paola Recabarren e Ingrid, por facilitar las muestras para este trabajo.

A mis grandes amigas, Claudia González y Claudia Montenegro, por hacer realidad lo que me dijeron en la primera pensión en que estuve cuando llegué: "los mejores amigos son los con quienes creces en la Universidad".

A mis otras amigas desde el principio, Caria Gallardo y Alejandra de la Fuente, con quienes he compartido muchas cosas.

A los que están siempre en mi corazón, mi familia, por su cariño y apoyo incondicionales.