



TESIS DOCTORAL

**El papel de los alimentos en la
transmisión de *Escherichia coli*
potencialmente patógenas para el
hombre: prevalencia y caracterización de
cepas diarreagénicas y productoras de
 β -lactamasas de espectro extendido**

Alexandra Herrera Estévez

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOXÍA E PARASITOLOXÍA
FACULTADE DE VETERINARIA
LUGO, 2015**



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

D. Jorge Blanco Álvarez.

Catedrático del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC.

Dña. Azucena Mora Gutiérrez.

Profesor Contratado Doctor del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC.

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada “El papel de los alimentos en la transmisión de *Escherichia coli* potencialmente patógenas para el hombre: prevalencia y caracterización de cepas diarregénicas y productoras de β -lactamasas de espectro extendido.”

Presentada por Dña. ALEXANDRA HERRERA ESTÉVEZ.

Alumna del Programa de Doctorado: Microbiología e Parasitología.

Autorizan la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurrir en las causas de abstención establecidas en la Ley 30/1992.

Lugo, 1 de septiembre de 2015

Fdo. Jorge Blanco Álvarez

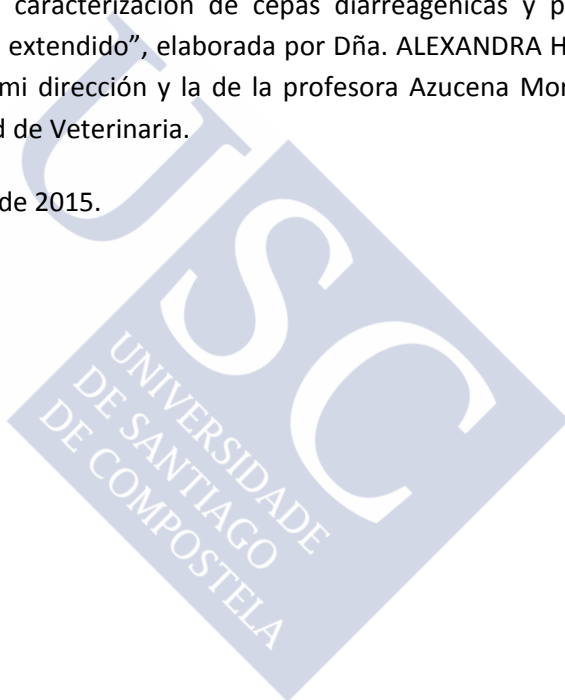
Fdo. Azucena Mora Gutiérrez



Jorge Blanco Álvarez, como Director del Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC) del Departamento de Microbiología e Parasitología de USC, informo:

Que la presente Memoria experimental de la Tesis Doctoral titulada “El papel de los alimentos en la transmisión de *Escherichia coli* potencialmente patógenas para el hombre: prevalencia y caracterización de cepas diarreagénicas y productoras de β -lactamasas de espectro extendido”, elaborada por Dña. ALEXANDRA HERRERA ESTÉVEZ, ha sido realizada bajo mi dirección y la de la profesora Azucena Mora Gutiérrez en el LREC-USC de la Facultad de Veterinaria.

Lugo, 1 de septiembre de 2015.



Fdo. Jorge Blanco Álvarez
Catedrático de Microbiología
Director del Laboratorio de Referencia de *E.coli* (LREC). Laboratorio Nacional de Referencia para la Detección de *E.coli* en Alimentos
Departamento de Microbiología e Parasitología
Facultade de Veterinaria
Universidade de Santiago de Compostela

Esta tesis ha sido financiada por:

El proyecto FIS PI09/01273 y la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/008/1018 y 1016) (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España), por los proyectos 09TAL007261PR y EM2014/001 y los programas de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas 2007/000044-0 y CN2012/303 de la Xunta de Galicia (Consellería de Economía e Industria y Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Fondo Europeo para el Desarrollo Regional), y por el por el proyecto AGL2013-47852-R (Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España).



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a:

Jorge Blanco, por la dirección de la tesis, por la revisión crítica de la memoria y por la confianza depositada en mí durante todos estos años.

Azucena Mora, por la dirección de la tesis, por su colaboración en el estudio de electroforesis en campos pulsados y en la obtención de la memoria. Pero por encima de todas las cosas, por su dedicación, por regalarme su tiempo, y por enseñarme una de las cosas más importantes que he aprendido todos estos años, que con un poco de cariño las cosas siempre salen mejor, de corazón...muchísimas gracias.

Miguel Blanco, por su ayuda en el análisis de las secuencias genéticas y porque de ti he aprendido algo muy importante, que las cosas no siempre son como uno quiere y, sin embargo, el sol vuelve a salir cada mañana.

Jesús Blanco, por su ayuda en la dirección del serotipado de las cepas.

Ghizlane Dahbi, por su ayuda en el serotipado y determinación del tipo de intiminas, por enseñarme tantas cosas, por cuadricular mi cabeza, por llevarme de la mano tantos años y por soltarme en el momento justo, como siempre...sin palabras.

Cecilia López, por su ayuda especialmente en los estudios de PFGE y de clonotipado y por estar siempre dispuesta a echar una mano.

Susana Viso, por su ayuda en la parte experimental de este estudio, por su compañía y amistad.

Juan Marzoa, Rosalía Mamami e Isidro García, por la compañía durante los meses de escritura, sin vosotros no habría sido igual.

Montserrat Lamela, por el apoyo técnico en la realización de la parte experimental del estudio.

María Pilar Alonso, Fernando García-Garrote, Amparo Coira, Julia Pita Carretero, de la Unidad de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) de Lugo, por el aislamiento de las cepas de *E. coli* de origen clínico y por su ayuda en la realización de los antibiogramas.

A Veronika Tchesnokova y Mariya Billig (Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA), por su ayuda en la determinación de los alelos *fimH*.

A mis amigos, porque la vida sin vosotros estaría incompleta, por escucharme SIEMPRE y no abandonarme NUNCA, a VOSOTROS...muchas gracias.

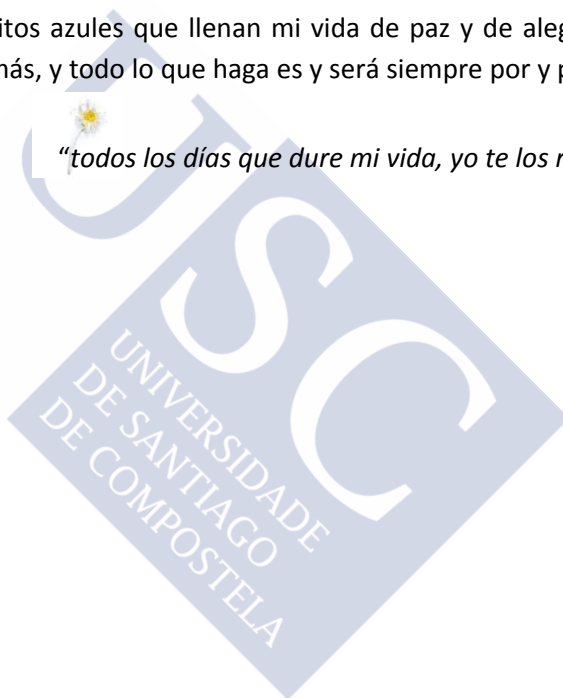
A mi familia, los de aquí y los de allá, todos siempre tan lejos y tan cerca, os quiero.

A los que se fueron sin avisar, gracias por empujarme desde arriba hasta el final, estoy segura de que así ha sido, habéis dejado un hueco que jamás podré llenar.

A ti, por tu comprensión, por rodearme de algodones hasta conseguirlo, por el amor con el que llenas mi vida..."nunca dejaré de agradecerte cada luz que has encendido en el salón, eres patrimonio de mi suerte...y es que yo encontré la vida en tus abrazos y aprendí que lo importante pasa hoy..."

Y por último, a esos ojitos azules que llenan mi vida de paz y de alegría, eres lo mejor que he hecho jamás, y todo lo que haga es y será siempre por y para ti.

"todos los días que dure mi vida, yo te los regalo niña"





A Loló,
*“Volá, pero volá a justa altura,
ni tan alto que se te quemen las alas,
ni tan baixo que te alcancen las miserias humanas”*
B. Cometta Manzoni, 1930
Te echaré de menos siempre



ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y TÉRMINOS	IV
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Escherichia coli</i> : características generales	1
1.2. Clasificación serológica	2
1.3. Patotipos de <i>E. coli</i>	3
1.3.1. <i>E. coli</i> patógenos extraintestinales (ExPEC)	4
1.3.1.1. <i>E. coli</i> productor de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	7
1.3.1.2. Grupo clonal ST131	13
1.3.2. <i>E. coli</i> diarreagénicos	17
1.3.2.1. <i>E. coli</i> enterotoxigénicos (ECET)	19
1.3.2.2. <i>E. coli</i> enteroinvasivos (ECEI)	21
1.3.2.3. <i>E. coli</i> enteroagregativos (ECEA)	22
1.3.2.4. <i>E. coli</i> enteropatógenicos (ECEP)	24
1.3.2.4.1. Reservorio de ECEP	31
1.3.2.5. <i>E. coli</i> verotoxigénicos (ECVT)	32
1.3.2.5.1. Reservorio de ECVT	36
1.3.2.5.2. Resistencia de los ECVT a los antibióticos	39
1.3.3. Grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	42
1.4. ECVT en alimentos	43
1.4.1. Ciclo de transmisión de ECVT	44
1.4.2. Epidemiología de los ECVT	45
1.4.2.1. Brotes por ECVT O157 y no O157	50
1.4.2.1.1. <i>E. coli</i> O104:H4 y “la crisis del pepino”	53
1.4.3. Supervivencia y crecimiento de ECVT O157 y no O157 en alimentos	57
1.4.4. ECVT en carnes	60
1.4.5. ECVT en productos agrícolas	78
1.4.6. ECVT productos lácteos	81
1.5. Otros <i>E. coli</i> diarreagénicos en alimentos	84
1.6. El papel de los alimentos en la transmisión de <i>E. coli</i> patógenos extraintestinales	85
1.7. Control de contaminación microbiológica en alimentos	89
1.8. Métodos de detección y caracterización de ECVT	93
1.9. Legislación y sistemas de vigilancia en seguridad alimentaria	98
2. OBJETIVOS	111
3. MATERIAL Y MÉTODOS	113
3.1. Cepas control y conservación de las cepas	113
3.2. Muestras de alimentos	115

3.3. Determinación del número más probable (NMP) de <i>E. coli</i> -----	117
3.4. Detección de cepas de <i>E. coli</i> diarreagénicas, ST131 y productoras de BLEE -----	118
3.4.1. Separación inmunomagnética (SIM) para la captura del antígeno O157 -----	119
3.4.2. PCR convencional -----	121
3.4.3. Secuenciación-----	128
3.4.4. PCR en tiempo Real (RT-PCR)-----	128
3.4.4.1. VT1 VT2 VTEC Screening Assay (Applied Biosystems/Life Technologies)-----	131
3.4.4.2. TaqVet Pathogenic™ <i>E. coli</i> Screening (Laboratoire Service International)-----	133
3.5. Identificación y caracterización fenotípica -----	136
3.5.1. Identificación y sensibilidad antimicrobiana-----	136
3.5.2. Serotipado-----	137
3.5.2.1. Determinación del antígeno O-----	137
3.5.2.2. Determinación del antígeno H-----	139
3.6. Definición de relaciones clonales y análisis de similitud -----	141
3.6.1. Clonotipado -----	141
3.6.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE) -----	142
3.7. Análisis estadístico -----	145
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	147
4.1. Número más probable de <i>E. coli</i> por gramo (NMP)-----	147
4.2. <i>E. coli</i> diarreagénicos -----	156
4.2.1. Prevalencia y patotipos -----	156
4.2.2. Serotipos de las cepas ECVT -----	169
4.2.3. Genes de virulencia de las cepas ECVT-----	175
4.2.4. Grupos filogenéticos de las cepas ECVT -----	180
4.2.5. Patrones de resistencia de las cepas ECVT-----	181
4.2.6. Perfiles de macrorrestricción obtenidos por PFGE de las cepas ECVT. Comparación con cepas de origen humano -----	184
4.2.7. Evaluación de protocolos de detección y aislamiento de ECVT en alimentos -----	190
4.2.7.1. Protocolo de detección y aislamiento de ECVT mediante PCR convencional -----	190
4.2.7.2. Detección de ECVT por PCR en tiempo real vs. PCR convencional-----	193
4.3. <i>E. coli</i> productoras de BLEE -----	196
4.3.1. Prevalencia y tipos-----	196
4.3.2. Caracterización de las cepas BLEE aisladas de CARNE DE VACUNO-----	203
4.3.2.1. Tipado de BLEE-----	203
4.3.2.2. Serotipos y genes de virulencia-----	203
4.3.2.3. Grupos filogenéticos -----	204
4.3.2.4. Clonotipos-----	204
4.3.3. Caracterización de las cepas BLEE aisladas de CARNE DE CERDO-----	204
4.3.3.1. Tipado de BLEE-----	204
4.3.3.2. Serotipos y genes de virulencia-----	205
4.3.3.3. Grupos filogenéticos -----	205
4.3.3.4. Clonotipos-----	206

4.3.4. Caracterización de las cepas BLEE aisladas de CARNE DE AVE -----	206
4.3.4.1. Tipado de BLEE -----	206
4.3.4.2. Serotipos y genes de virulencia -----	206
4.3.4.3. Grupos filogenéticos -----	208
4.3.4.4. Clonotipos -----	208
4.3.5. Caracterización de las cepas BLEE aisladas de PRODUCTOS AGRÍCOLAS -----	209
4.3.5.1. Tipado de BLEE -----	209
4.3.5.2. Serotipos y genes de virulencia -----	209
4.3.5.3. Grupos filogenéticos -----	209
4.3.5.4. Clonotipos -----	210
4.3.6. Patrones de resistencia de las cepas BLEE -----	210
4.3.7. Análisis comparativo de las cepas BLEE aisladas de alimentos -----	213
4.4. Grupo clonal ST131 -----	224
4.4.1. Prevalencia -----	224
4.4.2. Tipado de BLEE -----	227
4.4.3. Serotipos y grupos filogenéticos -----	227
4.4.4. Genes de virulencia -----	229
4.4.5. Clonotipos -----	232
4.4.6. Patrones de resistencia de las cepas O25b:H4-B2 (ST131) -----	233
4.4.7. Perfiles de macrorrestricción obtenidos por PFGE de las cepas O25b:H4-B2 (ST131): comparación con cepas de origen humano -----	235
4.5. Valoración del riesgo microbiológico de los alimentos muestreados en la ciudad de Lugo -----	242
5. CONCLUSIONES -----	247
6. BIBLIOGRAFÍA -----	251
6.1. Bibliografía general -----	251
6.2. Bibliografía Online -----	286
6.3. Legislación -----	288

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y TÉRMINOS

- **3GCREC** *E. coli* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación
- **A/E** Del inglés “attaching and effacing”
- **AECOSAN** Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
- **AFNOR** Association Française de Normalisation
- **AOAC** Association of analytical communities
- **APPC** Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
- **APT** Agua de peptona tamponada
- **A_w** Actividad de agua
- **BFP** Del inglés “bundle-forming pilus”
- **BLEE** β-lactamasas de espectro extendido
- **BPA** Buenas prácticas agrícolas
- **BPF** Buenas prácticas de fabricación
- **BPH** Buenas prácticas de higiene
- **CAR/PL** Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia
- **CDC** Centers for Disease Control and Prevention.
- **CDT** Del inglés “cytolethal distending toxin”
- **CEN** Comisión Europea de Normalización
- **CFA** Del inglés “colonization factor antigens”
- **CH** Colitis Hemorrágica/Clonotipado
- **CipR-noBLEE** Resistente a ciprofloxacina pero sensible a las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación
- **CLSI** The Clinical and Laboratory Standards Institute
- **CMI** Concentración Mínima Inhibitoria
- **CNF** Del inglés “cytotoxic necrotizing factor”
- **CSB** Del inglés “cell suspension buffer”
- **CT** Enterotoxina del cólera
- **C_T** Del inglés “cycle threshold value”.
- **DFM** Del inglés “direct-fed microbial”
- **DG SANCO** Directorate-General Health and Consumers
- **EAE** Del inglés “*E. coli* attaching and effacing”
- **EAF** Del inglés “EPEC adherence factor”.
- **EARSS** European Antimicrobial Resistance Surveillance System
- **EAST1** Del inglés “Enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1”
- **ECAD** *E. coli* de adherencia difusa.
- **ECDC** European Centre for Disease Prevention and Control.
- **ECEA** *E. coli* enteroagregativo
- **ECEI** *E. coli* enteroinvasivo
- **ECEP** *E. coli* enteropatogénico
- **ECEPa** *E. coli* enteropatogénico atípico
- **ECEPt** *E. coli* enteropatogénico típico
- **ECET** *E. coli* enterotoxigénico
- **ECVT** *E. coli* verotoxigénico
- **EE.UU.** Estados Unidos
- **EHEC** Del inglés “Enterohemorrhagic *E. coli*”
- **ELISA** Del inglés “enzyme-linked immunosorbent assays”
- **EPC** Del inglés “External Positive Control”
- **ESBL** Del inglés “Extended Spectrum β-lactamase”
- **EFSA** European Food Safety Authority

• ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
• EURL	European Union Reference Laboratory
• ExPEC	Del inglés “extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> ”
• FAO	Food and agriculture Organization of the United Nations
• FDA	Food and drug Administration, EE.UU.
• FEPEX	Federación Española de Productores y Exportadores de Frutas y Hortalizas
• FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente
• FSIS	USDA-Food Safety and Inspection Service
• FUTI	Del inglés “Foodborne urinary tract infections”
• FWD	Food- and water-disease
• HeLa	Células de carcinoma de cérvix humano, nombradas así en honor a la mujer de las que se extrajeron por primera vez, Henrietta Lacks
• HEp-2	Del inglés “Human Epidermoid carcinoma” (strain N°2)
• HNM	Antígeno H no móvil
• HNT	Antígeno H no tipable
• HULA	Hospital Universitario Lucus Augusti
• ibeA	Del inglés “invasión of brain endothelium”
• IPC	Del inglés “Internal Positive Control”
• ISO	International Standar Organization
• ISS	Istituto Superiore di Sanità
• iss	Del inglés “increased serum survival”
• ITU	Infección del tracto urinario
• LEE	Del inglés “locus of enterocyte effacement”
• ler	Del inglés “LEE encoded regulator”
• LPS	Lipopolisacárido
• LRCC	Laboratorio de Referencia de <i>E. coli</i> , USC
• LT	Del inglés “Heat-labile enterotoxin”
• MACL	MacConkey lactosa
• MACS	MacConkey sorbitol
• MACSTC	MacConkey sorbitol con telurito y cefixima
• MGB	Del inglés “Minor Groove Binder”
• MLST	Del inglés “Multilocus sequence typing”
• MLVA	Del inglés “Multi-locus variable number of tandem repeat analysis”
• MPC	Del inglés “Magnetic particle concentrator”
• NC	Del inglés “Negative Control”.
• NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Standards
• NFQ	Del inglés “Non Fluoronscent Quencher”
• NMP	Número más probable
• NR	No realizado
• NRL	National Reference Laboratory
• OMS	Organización Mundial de la Salud
• ONT	Antígeno O no tipable
• PAI	Del inglés “Pathogenicity islands”
• pb	Pares de bases
• PCC	Punto crítico de control
• PCR	Del inglés “Polymerase chain reaction”
• per	Del inglés “plasmid-encoded regulator”
• PFGE	Del inglés “Pulsed field gel electrophoresis”
• PTT	Púrpura trombocitopénica trombótica

- **qPCR** Del inglés “quantitative PCR”
- **RT-PCR** Del inglés “real time PCR”
- **sat** Del inglés “secreted autotransporter toxin”
- **SCVPH** Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health
- **SIM** Separación Inmunomagnética
- **ST** Del inglés “Heat Stable enterotoxin”
- **STEC** Del inglés “Shiga-like toxin producing *E. coli*”
- **Stx1/Stx2** Del inglés “Shiga toxins”, toxinas Shiga Stx1 y Stx2
- **SUH** Síndrome urémico hemolítico
- **T3SS** Del inglés “Type 3 Secretion System”
- **TE** Buffer Tris-EDTA
- **tsh** Del inglés “temperatura sensitive hemagglutinin”
- **UE** Unión Europea
- **UFC** Unidades formadoras de colonias
- **UPGMA** Del inglés “unweighted pair group method using arithmetic averages”
- **USDA** United States Department of agriculture
- **usp** Del inglés “uropathogenic strain-specific protein”
- **VCC** Vancomicina, cefixima y cefsulodin
- **vs.** *Versus*
- **VIH** Virus de inmunodeficiencia humana
- **VT1/VT2** Verotoxinas VT1 y VT2
- **WGS** Del inglés “whole genome sequencing”





RESUMEN

RESUMEN

El brote del 2011 provocado por el ECVT-ECEA O104:H4 en Europa marcó un antes y un después en la forma de entender y valorar las infecciones por *E. coli* diarreagénicos, ya que puso en evidencia el riesgo de que otros serotipos de ECVT pudieran emerger como patógenos importantes para los humanos en el futuro. Hasta esa fecha, la mayoría de los estudios se centraban exclusivamente en el serotipo enterohemorrágico O157:H7 y en la carne de vacuno como principal fuente de transmisión. Hoy en día es cada vez mayor el interés en el papel que juegan los *E. coli* diarreagénicos, principalmente los ECVT no O157, en las infecciones de origen alimentario, incluyendo todo tipo de alimentos. Debido a la dificultad que supone la detección y aislamiento en alimentos de todos los patotipos de *E. coli*, son muy pocos los laboratorios a nivel mundial que realizan su investigación de manera conjunta. Por otro lado, en los últimos años se ha producido un incremento significativo de cepas de *E. coli* productoras de BLEE debido fundamentalmente a la rápida diseminación de cepas que sintetizan enzimas de la familia CTX-M, tanto en ambiente hospitalario como en la comunidad. De especial preocupación es la emergencia a nivel mundial del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) productor de CTX-M-15 y otros tipos de enzimas BLEE, puesto que las cepas de dicho grupo clonal portan un enorme arsenal de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos. La posibilidad de que la cadena alimentaria sea un vehículo importante de transferencia de genes de resistencia de cepas de origen animal al ser humano ha sido planteada por diferentes investigadores, no obstante, muy pocos estudios han sido realizados hasta la fecha en alimentos.

Por todo lo expuesto, planteamos en esta Tesis Doctoral investigar conjuntamente la presencia de cepas de *E. coli* diarreagénicas, del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) y productoras de BLEE en diferentes alimentos de origen animal (carne de vacuno, porcino y ave) y de origen vegetal, con el objetivo de evaluar su calidad microbiológica, estudiar la presencia de estas cepas y sus características, conocer el papel de los alimentos en la transmisión de cepas productoras de BLEE y del grupo clonal O25b:H4-B2, y determinar el potencial de virulencia y grado de clonalidad de las cepas aisladas, comparándolas con cepas causantes de infecciones en seres humanos. Los resultados indican que un elevado porcentaje de las muestras de alimentos analizadas (17,5%) son positivas para el aislamiento de cepas que suponen un riesgo potencial desde el punto de vista microbiológico para la salud del consumidor. Por las prevalencias obtenidas, se confirman la carne de vacuno y de cerdo como fuente de transmisión de ECVT, y fundamentalmente la de ave como transmisora de ECEPa. Además, tanto los alimentos cárnicos como los productos agrícolas, son potenciales transmisores de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y del grupo clonal pandémico O25b:H4-B2 (ST131). Destaca por su especial riesgo la carne de ave, en la que se detecta un porcentaje significativamente superior de cepas con estatus ExPEC. Finalmente, evidenciamos el potencial riesgo de emergencia de nuevos patotipos de *E. coli* en alimentos, tal y como sucedió en el brote de Alemania, con posibilidades reales de transmisión al hombre, en base a la coexistencia en un mismo alimento de cepas de *E. coli* pertenecientes a diferentes patotipos, portadoras de un variado repertorio de genes de virulencia y de resistencias, y con alta similitud con cepas de origen humano.

PALABRAS CLAVE: *E. coli*, ECVT, BLEE, ExPEC, O25b:H4-B2 (ST131)

SUMMARY

The 2011 outbreak caused by STEC-EAEC O104:H4 in Europe meant a before and after in the way we understand and assess diarrheagenic *E. coli* infections, as it highlighted the risk that others STEC serotypes could emerge in the future as important human pathogens. Until that date, most studies focused exclusively on the STEC serotype O157:H7, and beef as the main source of transmission. Nowadays, the role played by diarrheagenic *E. coli* in food-borne infections on all types of food, and non-O157 STEC in particular, is receiving widespread attention. However, due to the difficulty of detection and isolation in food of all pathotypes of *E. coli*, there are only a few laboratories worldwide which are capable of simultaneously studying all pathotypes. Furthermore, in recent years, there has been a significant increase of *E. coli* ESBL producing strains, mainly due to the rapid spread of strains that synthesize enzymes of the CTX-M family, both in hospital settings and within the community. Of particular concern is the worldwide emergence of the clonal group O25b:H4-B2 (ST131) CTX-M-15-producing and other ESBL enzymes; since strains of the clonal group bear both a huge arsenal of virulence genes as well as antibiotic resistance. The possibility that the food chain could be an important vehicle of transmission of resistance genes of animal origin strains to humans has been proposed by different researchers, however, until now, few studies have been conducted on food.

For all these reasons, in this PhD thesis we propose to study simultaneously the presence of diarrheagenic *E. coli* strains, clonal group O25b:H4-B2 (ST131) strains and ESBL-producing strains in foods from different animal (beef, pork, poultry) and vegetable sources, in order to: assess their microbiological quality; study the presence of these strains and their characteristics; understand the role of food in the transmission of ESBL-producing and clonal group O25b:H4-B2 strains; and determine the potential virulence and level of clonality of isolated strains by comparing them to strains which cause human infections. The results indicate that a high percentage of food samples analyzed (17.5%) were positive for the isolation of strains that represent a potential risk to consumer health from a microbiological point of view. Due to the prevalence obtained, we confirm beef and pork as sources of STEC transmission, and fundamentally avian meat as an aEPEC transmitter. In addition, foods from animal and vegetable sources are potential transmitters of *E. coli* ESBL-producing and the pandemic clonal group O25b:H4-B2 (ST131) strains. Avian meat stands out by its special risk, in which a significantly higher percentage of strains with ExPEC status is detected. Finally, we demonstrate the potential risk of the emergence of new *E. coli* pathotypes in food, as in the recent German outbreak, with a real chance of transmission to humans, based on the coexistence in the same food of *E. coli* strains from different pathotypes, carriers of an assorted repertory of virulence and resistance genes, and high similarity with strains of human origin.

KEYWORDS: *E. coli*, STEC, ESBL, ExPEC, O25b:H4-B2 (ST131)

RESUMO

O brote do 2011 provocado polo ECVT-ECEA O104:H4 en Europa marcou un antes e un despois na forma de entender e valorar as infeccións por *E. coli* diarreaxénicos, xa que puxo en evidencia o risco de que outros serotipos de ECVT puidesen emerxer como patóxenos importantes para os humanos no futuro. Ata esa data, a maioría dos estudos centrábanse exclusivamente no serotipo enterohemorráxico O157:H7 e na carne de vacún como principal fonte de transmisión. Hoxe en día é cada vez maior o interese no papel que xogan os *E. coli* diarreaxénicos, principalmente os ECVT non O157, nas infeccións de orixe alimentaria, incluíndo todo tipo de alimentos. Debido á dificultade que supón a detección e illamento en alimentos de todos os patotipos de *E. coli*, son moi poucos os laboratorios a nivel mundial que realizan a súa investigación de xeito conxunto. Por outro lado, nos últimos anos produciuse un incremento significativo de cepas de *E. coli* produtoras de BLEE debido fundamentalmente, á rápida diseminación de cepas que sintetizan encimas da familia CTX-M, tanto no ambiente hospitalario coma na comunidade. De especial preocupación é a emerxencia a nivel mundial do grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) produtor de CTX-M-15 e outros tipos de encimas BLEE, posto que as cepas do devandito grupo clonal portan un enorme arsenal de xenes de virulencia e de resistencia a antibióticos. A posibilidade de que a cadea alimentaria sexa un vehículo importante de transferencia de xenes de resistencia de cepas de orixe animal ó ser humano foi formulada por diferentes investigadores, non obstante, moi poucos estudos foron realizados ata a data en alimentos.

Por todo o exposto, formulamos nesta Tese Doutoral investigar conxuntamente a presenza de cepas de *E. coli* diarreaxénicas, do grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) e produtoras de BLEE en diferentes alimentos de orixe animal (carne de vacún, porcino e ave) e de orixe vexetal, co obxectivo de avaliar a súa calidade microbiolóxica, estudar a presenza destas cepas e as súas características, coñecer o papel dos alimentos na transmisión de cepas produtoras de BLEE e do grupo clonal O25b:H4-B2, e determinar o potencial de virulencia e grao de clonalidade das cepas illadas, comparándoas con cepas causantes de infeccións en seres humanos. Os resultados indican que unha elevada porcentaxe das mostras de alimentos analizadas (17,5%) son positivas para o illamento de cepas que supoñen un risco potencial dende o punto de vista microbiolóxico para a saúde do consumidor. Polas prevalencias obtidas, confírmase a carne de vacún e de porco como fonte de transmisión de ECVT, e fundamentalmente a de ave como transmisora de ECEPa. Ademais, tanto os alimentos cárnicos coma os produtos agrícolas, son potenciais transmisores de cepas de *E. coli* produtoras de BLEE e do grupo clonal pandémico O25b:H4-B2 (ST131). Destaca polo seu especial risco a carne de ave, na que se detecta unha porcentaxe significativamente superior de cepas con status ExPEC. Finalmente, evidenciamos o potencial risco de emerxencia de novos patotipos de *E. coli* en alimentos, tal e como sucedeu no brote de Alemaña, con posibilidades reais de transmisión ó home, sobre a base da coexistencia nun mesmo alimento de cepas de *E. coli* pertencentes a diferentes patotipos, portadoras dun variado repertorio de xenes de virulencia e de resistencias, e con alta similitude con cepas de orixe humana.

PALABRAS CHAVE: *E. coli*, ECVT, BLEE, ExPEC, O25b:H4-B2 (ST131)



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Escherichia coli*: características generales

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1986; Blanco *et al.* 2002; Kaper *et al.* 2004; Beutin, 2006; Bettelheim, 2007). Fue descrito por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich tras aislarlo de las heces de un niño sano, bautizándolo inicialmente con el nombre de *Bacterium coli* (Escherich, 1885).

Es quizá el organismo procariota más estudiado por el ser humano debido a su facilidad de crecimiento (una división celular cada 20 min a 37 °C en un medio nutritivo), lo que ha hecho de esta bacteria el candidato ideal para experimentos de genética y biología molecular. Desde que fue descubierta se ha convertido en una de las especies bacterianas más comúnmente aisladas en laboratorios de microbiología clínica.

E. coli es la especie predominante de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa saprofítica del tubo digestivo de la mayor parte de los mamíferos, colonizando el tracto gastrointestinal del neonato a las pocas horas de vida (Hartl y Dykhuizen, 1984; Gordon y Cowling, 2003). Junto al resto de bacterias presentes en el intestino, *E. coli* realiza diferentes funciones de carácter fisiológico beneficiosas para el hospedador, tales como el aporte de nutrientes esenciales para el epitelio intestinal, su papel en la síntesis de la vitamina K, el procesamiento de los residuos alimentarios, el constante estímulo de la respuesta inmune en el hospedador o la inhibición competitiva que ejerce sobre el crecimiento de todo tipo de enteropatógenos (Kruis, 2004).

Al tratarse de una bacteria intestinal, *E. coli* se excreta diariamente con las heces de manera abundante. Las heces de un individuo sano contienen entre 10^8 y 10^9 *E. coli*/g, como la masa fecal media es de unos 200 g, esta masa contendrá $2 \times 10^{10} - 10^{11}$ *E. coli*. Por tanto, la población humana excreta al medio ambiente sobre $10^{20} - 10^{21}$ *E. coli* diarios, una cantidad que se ve incrementada por las excreciones de los animales. Muchos de estos *E. coli* sobreviven, al menos inicialmente, en el medio ambiente, en el agua y en los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Hartl y Dykhuizen, 1984).

Si bien la mayor parte de los aislados de *E. coli* forman parte de la microbiota intestinal de la mayoría de los mamíferos donde juega un papel inocuo o incluso beneficioso para el hospedador, algunas cepas de *E. coli* se consideran patógenas, debido a la adquisición de factores de virulencia específicos que les confieren la capacidad de producir una amplia variedad de infecciones en seres humanos y animales, tanto de tipo entérico (diarreas, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y enfermedad de los edemas) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, e infecciones pulmonares y de heridas). Por lo tanto, las cepas de *E. coli* se clasifican en tres categorías en función de su grado de patogenicidad y del tipo de infecciones que producen: comensales, patógenas entéricas y patógenas extraintestinales (Russo y Johnson, 2000).

Se estima que al año se producen en el mundo 1,7 billones de casos de diarreas en seres humanos, de los cuales un cuarto son provocadas por *E. coli* y que éstas provocan más de 700.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo (aproximadamente 375.000 niños menores de 5 años mueren al año por *E. coli*) (OMS, 2005; UNICEF/OMS, 2009, Walker *et al.* 2013). Es además, el patógeno más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias. En animales las colibacilosis son muy frecuentes, incidiendo esencialmente en animales de pocos días de edad y en recién destetados, ocasionando importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado bovino, porcino y ovino, así como en la cría intensiva de aves y conejos (Blanco *et al.* 1991, 2001, 2003; Blanco M. *et al.* 2003b; Blanco y Blanco M., 1993; Blanco J.E. *et al.* 1996a).

1.2. Clasificación serológica

El primer método que resultó de una gran utilidad para realizar la diferenciación de las cepas patógenas de *E. coli* de las que no lo son fue desarrollado por Kauffmann en 1947. Kauffmann propuso un sistema basado en la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos de la membrana externa de la pared celular), K (capsulares) y H (flagelares) (Figura 1). Esta forma de clasificación serológica resultó ser muy útil en los estudios epidemiológicos y en su día representó el primer método que permitió hacer una aproximación al estudio de la clonalidad de las cepas, facilitando la diferenciación

entre cepas virulentas e inocuas, y permitiendo la detección de brotes. En la actualidad se reconocen del orden de 180 antígenos O (O1 a O185), 72 antígenos K (K1 a K103) y 56 antígenos H (H1 a H56), y aunque existen numerosas combinaciones o serotipos O:K:H, tan solo algunas son frecuentes entre las cepas patógenas. La determinación de los antígenos O y H se realizan por técnicas de aglutinación, mientras que la identificación del antígeno K es recomendable que se realice por contraelectroforesis (Guinée *et al.* 1981; Orskov y Orskov, 1984; Ewing, 1986).

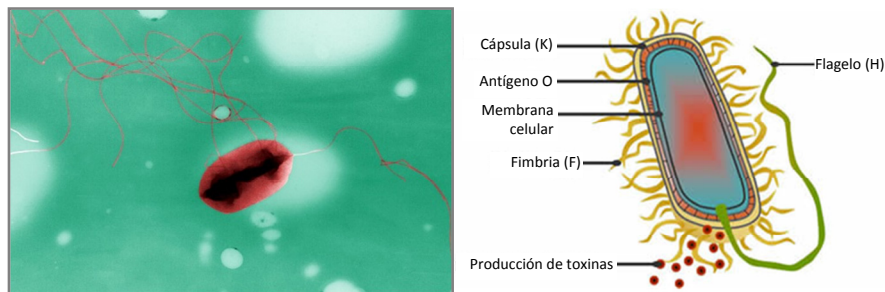


Figura 1. Fotografía de la bacteria *Escherichia coli* y esquema en el que se representan los principales antígenos de superficie (O, K y H) y algunos factores de virulencia (<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp> y esquema adaptado de Fairbrother, 2015)

1.3. Patotipos de *E. coli*

Actualmente la diferenciación entre cepas patógenas y no patógenas de *E. coli* se realiza mediante la caracterización de sus antígenos superficiales (serotipo) y la caracterización de sus genes de virulencia (patotipo). De este modo, el término seropatotipo hace referencia al conjunto de los antígenos superficiales y los factores de virulencia que caracterizan a la cepa (serotipo más patotipo).

La virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial, de manera que las cepas patógenas presentan diferentes tipos de factores de virulencia que suelen ser adquiridos por mecanismos de intercambio genético bacteriano.

Entre los factores de virulencia de *E. coli* cabe destacar: la expresión de adhesinas que facilitan la adherencia a las superficies corporales (colonización); la síntesis de proteínas que confieren a la bacteria la capacidad de invadir diferentes tejidos (invasividad); la producción de toxinas (inducción al daño al hospedador); la síntesis de enzimas que son excretadas al medio con distintas funciones (evasión de las defensas del hospedador);

diferentes sistemas de captación de hierro y mecanismos de resistencia al suero y a la fagocitosis; etc.

En base a sus serotipos, a los factores de virulencia que presentan, a sus mecanismos de patogénesis y a las infecciones y síndromes que causan, las cepas patógenas de *E. coli* se engloban en dos grandes categorías: *E. coli* patógenos extraintestinales y *E. coli* diarreagénicos.

1.3.1. *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC)

E. coli es uno de los microorganismos que se asocia con mayor frecuencia a infecciones extraintestinales, tanto en seres humanos como en animales. Entre las infecciones que provoca están las infecciones del tracto urinario (ITU), bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, infecciones pulmonares y de heridas (Domingue *et al.* 1985; Blanco *et al.* 1991; Blanco M. *et al.* 1996, 1997a, Dalmau *et al.* 1996; Abe *et al.* 2008; Houdouin *et al.* 2008; Manges *et al.* 2008; Mora *et al.* 2009b).

El grupo de los ExPEC es responsable del 20% al 30% de las bacteriemias de la comunidad y del 20% de las nosocomiales, siendo el patógeno más prevalente. Estas infecciones se originan en el tracto urinario y en la cavidad intrabdominal. Comúnmente se dan en individuos con enfermedades de base o con enfermedades crónicas de larga evolución. Su pronóstico suele ser mejor que la infección por otros microorganismos bacilo gram negativos, con una tasa de mortalidad de entre el 4% y el 18%, que se asocia principalmente a leucopenia, inmunodepresión y a la adquisición nosocomial. No obstante, en los últimos 10 años las cepas de *E. coli* bacteriémicas han desarrollado un incremento progresivo de resistencia a antibióticos, lo cual dificulta su tratamiento (Javaloyas *et al.* 2003; Oteo *et al.* 2006; Jones *et al.* 2008; Naseer *et al.* 2009).

Se han desarrollado 2 teorías para explicar la relación entre las cepas fecales de *E. coli* y las causantes de ITU: la teoría de la prevalencia y la teoría de la especial patogenicidad. La primera sostiene que la cepa presente en mayor abundancia en la microbiota normal intestinal es la que generalmente causa las ITU, mientras que la segunda teoría apoya la idea de que solo determinadas cepas con factores de virulencia son capaces de producir las infecciones extraintestinales. Los resultados obtenidos en las décadas de los ochenta y

noventa del siglo pasado confirman la validez de la teoría de la especial patogenicidad, ya que se comprobó que las cepas causantes de ITU presentaban una serie de factores de virulencia que les permite invadir, colonizar y dañar el tracto urinario, provocando infecciones urinarias bajas y altas (Korhonen *et al.* 1985; Orskov y Orskov, 1985; Blanco *et al.* 1991; Johnson, 1991; Blanco M. *et al.* 1996).

En el año 2000, Russo y Johnson proponen una nueva designación para las cepas de *E. coli* que causaban infecciones extraintestinales, de esta manera, a estas cepas se les llamará ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) si poseen factores de virulencia extraintestinales actualmente reconocidos o si demuestran su potencial de virulencia en un modelo animal para infección extraintestinal.

El grupo de los ExPEC exhibe una considerable diversidad genética que se traduce, entre otros aspectos, en un amplio rango de factores de virulencia asociados, como son: adhesinas (fimbrias P, S, F1C); toxinas (hemolisina, factor citotóxico necrotizante); factores de adquisición de hierro (aerobactina, salmoquelina); lipopolisacáridos (LPS); polisacáridos capsulares (cápsulas del grupo I, II, III); e invasinas (*IbeA*), los cuales se encuentran frecuentemente codificados en islas de patogenicidad (PAI), en otros elementos de ADN móviles, o en el cromosoma bacteriano (Blanco *et al.* 1992; Moulin-Schouleur *et al.* 2006; Bidet *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2008; Olesen *et al.* 2009). Los principales genes de virulencia asociados a cepas ExPEC se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales factores de virulencia de cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales

Genes	Descripción ADHESINAS
<i>fimH</i>	Fimbrias tipo 1: fimbria sensible a la manosa, presentes en el 99% de las cepas de <i>E. coli</i>
<i>fimAV_{MT78}</i>	Fimbrias tipo 1: variante del <i>fimA_{MT78}</i> de las fimbrias tipo 1
<i>papEF</i>	Fimbrias tipo P: fimbria resistente a la manosa, región central del operón <i>pap</i> , asociada a pielonefritis, urosepsis, cistitis aguda y bacteriuria asintomática Localizados en una isla de patogenicidad cromosómica
<i>papG I</i>	Fimbrias tipo P: adhesina del extremo del pilus, alelo poco frecuente
<i>papG II</i>	Fimbrias tipo P: adhesina del extremo del pilus, alelo asociado a pielonefritis
<i>papG III</i>	Fimbrias tipo P: adhesina del extremo del pilus, alelo asociado a cistitis
<i>sfa/focDE</i>	Fimbrias tipo S: región central de los operones <i>sfa</i> y <i>foc</i> , asociada a septicemia y meningitis
<i>afa/draBC</i>	Adhesina resistente a la manosa, promueven la persistencia bacteriana dentro del tracto urinario. Asociada con ITU infantil y pielonefritis en mujeres embarazadas

TOXINAS	
<i>cnf1</i>	Factor necrotizante citotóxico (cytotoxic necrotizing factor), asociado a diversas infecciones extraintestinales, así como a necrosis y multinucleación de las células HeLa, Vero y CHO. Localizados en una isla de patogenicidad cromosómica
<i>cdtB</i>	Toxina de distensión citoletal (cytolethal distending toxin), asociada a infecciones extraintestinales e intestinales
<i>sat</i>	Proteína autotransportadora (secreted autotransporter toxin), altera el citoesqueleto de las células epiteliales de la vejiga y el riñón, incrementando la habilidad de <i>E. coli</i> para propagarse
<i>hlyA</i>	α -hemolisina, citotoxina calcio dependiente, facilita el crecimiento de los microorganismos en los tejidos corporales gracias al suministro de iones Fe^{+3} . Asociada a ITU, sepsis, apendicitis, peritonitis y otras infecciones extraintestinales. Localizado en plásmidos o en el cromosoma bacteriano
SIDERÓFOROS	
<i>iroN</i>	Codifica para el receptor de salmoquelina (sideróforo)
<i>iucD</i>	Aerobactina (adquisición de hierro). Localizado en plásmidos o en el cromosoma bacteriano
<i>iutA</i>	Receptor de la aerobactina
CÁPSULA	
<i>KpsM II</i>	Cápsula del grupo II, localizado en cepas de <i>E. coli</i> causantes de infecciones extraintestinales
<i>KpsM II-K2</i>	K2, cápsula grupo II
<i>kpsM II-K5</i>	K5, cápsula grupo II
<i>neuC-K1</i>	Antígeno K1, relacionado con la resistencia al suero, cápsula grupo II
<i>kpsM III</i>	Cápsula del Grupo III, localizado en cepas de <i>E. coli</i> causantes de infecciones extraintestinales
VARIOS	
<i>cvaC</i>	Gen estructural de la colicina V, con actividad letal contra ciertos organismos entéricos, aumenta la supervivencia de las bacterias que la producen. Localizado en plásmidos
<i>iss</i>	Proteína que incrementa la supervivencia en suero (increased serum survival)
<i>traT</i>	Proteína asociada con la resistencia al suero
<i>malX</i>	Marcador asociado a la isla de patogenicidad PAI
<i>ibeA</i>	Proteína (invasion of brain endothelium) que contribuye a que la bacteria atraviese la barrera hemato-encefálica y penetre en el sistema nervioso central
<i>usp</i>	Proteína que actúa como una bacteriocina (uropathogenic strain-specific protein), permite a las cepas lisar otras cepas no virulentas de <i>E. coli</i> , favoreciendo la competición contra otras cepas de <i>E. coli</i> que ocupan el mismo nicho, aumentando su infectividad en el tracto urinario
<i>tsh</i>	Proteína de superficie termosensible que posee la capacidad de aglutinar los enterocitos a 26 °C (temperature sensitive hemagglutinin)

Johnson y colaboradores (2003a), mediante análisis estadísticos, identificaron como independientemente predictivos 5 marcadores de virulencia (*pap*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iucD* y *kpsM II*), y propusieron como criterio para la determinación del estatus ExPEC de las cepas de *E. coli*, la presencia de 2 o más de dichos marcadores.

A pesar de la variedad de patologías que las cepas ExPEC pueden causar en los seres humanos y los animales, parecen ser incapaces de causar enfermedades entéricas, pero

pueden colonizar de una manera estable el tracto intestinal del hospedador y muchos constituyen parte de la microbiota predominante (20%) de hospedadores sanos (humanos y animales), los cuales se convierten en reservorio de este tipo de cepas que pueden, bajo determinadas circunstancias, pasar al tracto urinario o a la sangre, provocando así la infección. Por lo tanto, la adquisición por parte de un huésped de una cepa patógena extraintestinal no es suficiente para que se produzca la infección, para ello es necesaria la entrada del microorganismo a un órgano extraintestinal.

Como se ha indicado anteriormente, las cepas ExPEC también causan infecciones extraintestinales en animales, incluidos animales domésticos y mascotas. Se ha demostrado que las cepas ExPEC de animales y humanos comparten factores de virulencia, lo que sugiere que estos microorganismos podrían ser patógenos zoonóticos.

Las cepas de ExPEC han sido aisladas de productos alimentarios, en particular de carnes crudas y aves de corral, lo que indica que estos microorganismos podrían representar potencialmente una nueva clase de patógenos causantes enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) (Smith *et al.* 2007; Bélanger *et al.* 2011; Manges y Johnson, 2012).

1.3.1.1. *E. coli* productor de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Los antibióticos β -lactámicos son bactericidas e inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana al impedir la última etapa de las síntesis del peptidoglucano, la transpeptidación. Su actividad la ejercen actuando como análogos estructurales del sustrato natural (D-alanil-D-alanina) de las transpeptidasas y carboxipeptidasas (Murray *et al.* 2006; Coira, 2008).

Los preparados β -lactámicos originales se obtuvieron a partir de hongos y bacterias. Sin embargo, el verdadero punto de partida en el desarrollo de los antibióticos β -lactámicos tuvo lugar con la síntesis del núcleo de las penicilinas y las cefalosporinas, el ácido 6-aminopenicilánico (6-PA) y el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), que han permitido la obtención de numerosas penicilinas y cefalosporinas semisintéticas.

Las principales familias de antibióticos β -lactámicos son las penicilinas, las cefalosporinas, las cefamicinas, los carbapenemas y los monobactámicos (Tabla 2).

Tabla 2. Antibióticos β -lactámicos (adaptación de Murray *et al.* 2006; Calvo y Martínez-Martínez, 2009)

Grupo	Antibióticos	
PENICILINAS	Penicilinas naturales	Bencilpenicilina/penicilina G, penicilina V
	Resistentes a penicilinasas	Meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina
	Penicilinas de amplio espectro	<u>Aminopenicilinas</u> : ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina
		<u>Ureidopenicilina</u> : piperacilina, mezlocilina
	Combinaciones con inhibidor de β -lactamasas	Ampicilina/sulbactam
Amoxicilina/ácido clavulánico		
Ticarcilina/ácido clavulánico		
Piperacilina/tazobactam		
CEFALOSPORINAS	Cefalosporinas espectro reducido-1ª generación	Cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefadrina
	Cefalosporinas de espectro ampliado-2ª generación	Cefaclor, cefuroxima, cefamandol
	Cefalosporinas de amplio espectro-3ª generación	Cefixima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefpodoxima
	Cefalosporinas de máximo espectro-4ª generación	Cefepima, cefpiroma
CEFAMICINAS	Cefamicinas de espectro ampliado-2ª generación	Cefoxitina, cefotetán
CARBAPENEMAS		Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem
MONOBACTÁMICOS		Aztreonam

Las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos β -lactámicos mediante la producción de β -lactamasas que los inactivan. Se han descrito más de 200 β -lactamasas diferentes, algunas son específicas para penicilinas (penicilinasas), cefalosporinas (cefalosporinidasas) o carbapenémicos (carbapenemasas), mientras que otras poseen un espectro amplio de actividad, incluyendo algunas que son capaces de inactivar a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos (Murray *et al.* 2006).

Las β -lactamasas están codificadas en genes que pueden localizarse tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos. El grado de resistencia conferida por este tipo de enzimas depende fundamentalmente de la cantidad de enzima producida y está modulada por factores de permeabilidad. Su hiperproducción puede conferir resistencia a las combinaciones β de amoxicilina-clavulánico e incluso piperacilina-tazobactam. En el caso de la enzima SHV-1 puede, además, conferir resistencia de bajo nivel a ceftazidima (cefalosporina de 3ª generación) (Coira, 2008; Navarro, 2009).

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se definen como enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactámicos, pero no las

cefamicinas o los carbapenemas. Se caracterizan por ser inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas de clase A (p.e. ácido clavulánico). Sus determinantes genéticos se encuentran generalmente en plásmidos y derivan de mutaciones puntuales de otras β -lactamasas con menor espectro como TEM-1, TEM-2 y SHV-1.

Las BLEE se describieron por primera vez en 1983 en cepas de *Klebsiella pneumoniae* en Alemania y actualmente están distribuidas por todo el mundo. Hasta la fecha, se han descrito 221 β -lactamasas del tipo TEM y 189 del tipo SHV (<http://www.lahey.org/Studies>), lo que da idea de la gran diversificación evolutiva que han sufrido estas enzimas en un corto periodo de tiempo, debido, esencialmente, a la presión selectiva de los antibióticos.

En 1989 se describió un nuevo tipo de BLEE, las cefotaximasas o CTX-M, prácticamente de forma simultánea en una cepa de *E. coli* en Alemania y en una cepa de *Salmonella* en Argentina. Estas BLEE, de naturaleza plasmídica al igual que las TEM o SHV, derivan de las β -lactamasas cromosómicas de distintas especies del género *Kluyvera*. Estas enzimas muestran solo un 40% de homología con las TEM y SHV, y se han caracterizado por conferir un alto grado de resistencia frente a la cefuroxima, cefotaxima y cefepima sin incrementar las CMI (concentración mínima inhibitoria) de la ceftazidima, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima comparada con la de las otras cefalosporinas (Oliver y Cantón, 2003).

A día de hoy, se han descrito 161 enzimas de tipo CTX-M (<http://www.lahey.org/Studies>) y pueden ser clasificadas según sus secuencias aminoacídicas en 5 subgrupos (Thirapanmethee, 2012) (Tabla 3):

Tabla 3. Subgrupos de BLEE tipo CTX-M

Subgrupo CTX-M	Ejemplos
CTX-M1	CTX-M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29, 30,32,33, 36, 36, 54
CTX-M2	CTX-M-2, 4, 6, 7, 20, 31, 44
CTX-M8	CTX-M-8, 40, 63
CTX-M9	CTX-M-9, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 45, 46, 47, 48, 49, 50
CTX-M25	CTX-M-25, 26, 39, 41

Existen dos sistemas para clasificar las BLEE, el sistema molecular de Ambler (Ambler, 1980) y el funcional de Bush-Jacoby-Medieros (Bush *et al.* 1995). Sin embargo, el sistema

más utilizado a nivel mundial es la clasificación de Ambler que divide a las β -lactamasas en 4 grupos (A, B, C, y D) basándose en su secuencia aminoacídica (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de las β -lactamasas, esquema molecular de Ambler y funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.* 1995)

Bush-Jacoby-Medeiros group	1989 Bush group (44)	Richmond-Sykes class (253)	Mitsuhashi-Inoue type (194) ^a	Molecular class (2, 121, 132)	Preferred substrates	Inhibited by:		Representative enzymes
						CA ^b	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cephalosporins	-	-	AmpC enzymes from gram-negative bacteria; MIR-1
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins	+	-	Penicillinases from gram-positive bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, cephalosporins	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b'	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillins, narrow-spectrum and extended-spectrum cephalosporins, monobactams	+	-	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins	±	-	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicillins, carbenicillin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicillins, cloxacillin	±	-	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+	-	Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	+	-	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 from <i>Serratia marcescens</i>
3	3	Not included	Not included	B	Most β -lactams, including carbapenems	-	+	L1 from <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA from <i>Bacteroides fragilis</i>
4	4	Not included	Not included	ND ^c	Penicillins	-	?	Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>

^a CSase, cephalosporinase; PCase, penicillinase; CXase, cefuroxime-hydrolyzing β -lactamase.

^b CA, clavulanic acid.

^c ND, not determined.

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE han emergido a nivel mundial de forma significativa, tanto en las infecciones adquiridas en la comunidad, como en las asociadas a cuidados sanitarios (Pitout *et al.* 2008). Asimismo, se ha incrementado la implicación de estos microorganismos como causa de infecciones nosocomiales (Rodríguez-Baño, 2006). Los programas de vigilancia realizados en Europa y otras áreas geográficas demuestran este incremento de la prevalencia y dispersión de cepas productoras de BLEE. Los últimos datos disponibles de la EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) (<http://ecdc.europa.eu/en/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>) del 2013 indican que más de la mitad de las cepas invasivas (de hemocultivos) reportadas a la Red de la EARSS eran resistentes a, al menos, uno de los antibióticos que se encuentran bajo vigilancia.

Según el informe, preocupa especialmente el aumento de las resistencias a cefalosporinas de 3ª generación (Figura 2) y la resistencia combinada de cefalosporinas de 3ª generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Varios países reportaron una tendencia al alza estadísticamente significativa para este tipo de resistencias durante el

periodo 2010-2013. De esta manera, el porcentaje de resistencias a cefalosporinas de 3ª generación en la población media de la Unión Europea (UE) aumentó significativamente, pasando del 9,5% en 2010 al 12,6% en 2013. Por el contrario, no se produjo un aumento significativo en cuanto a las resistencias combinadas durante el mismo periodo.

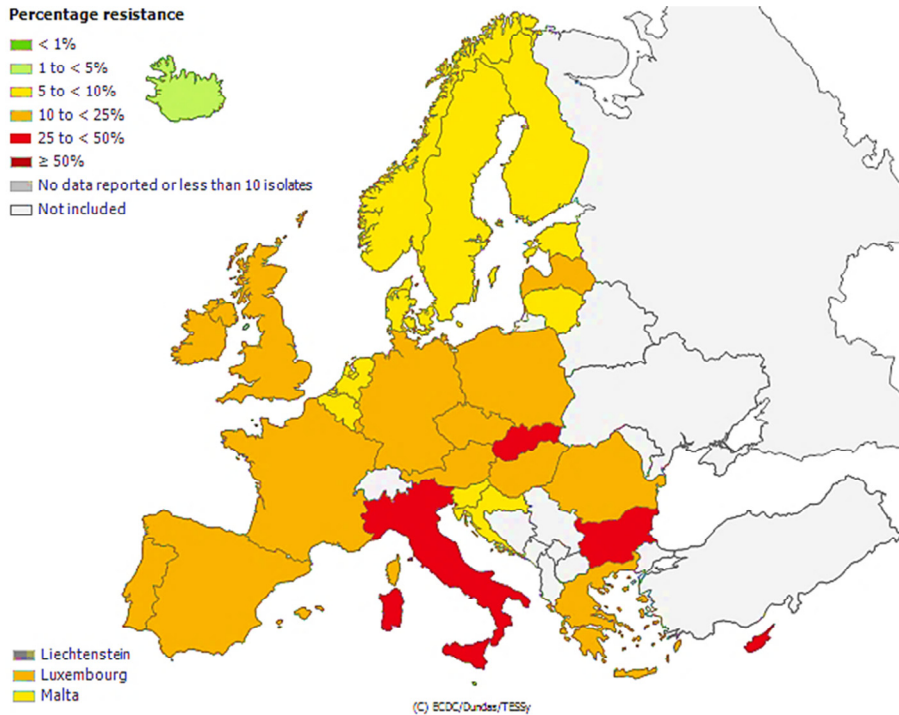


Figura 2. Porcentaje de cepas invasivas aisladas en Europa resistentes a cefalosporinas de 3ª generación en 2013 (www.ecdc.europa.eu)

Una gran proporción de las cepas invasivas resistentes a cefalosporinas de 3ª generación reportadas fueron confirmadas como BLEE por los países que participaban en el estudio en 2013. De esta manera, de los 22 países, 17 reportaron porcentajes de cepas BLEE que se encontraban entre el 85% y 100% (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de cepas invasivas resistentes a cefalosporinas de 3ª generación (3GCREC) confirmadas como BLEE por los laboratorios participantes de la UE, 2013 (www.ecdc.europa.eu)

País	Nº de laboratorios	Nº de 3GCREC	% BLEE
Dinamarca	5	121	73,6
Eslovaquia	14	240	74,6
Francia	51	861	76,5
Austria	21	196	81,6
Estonia	6	25	84
España	33	672	86,3
Polonia	36	113	87,6
Holanda	12	111	88,3
Letonia	5	18	88,9
Irlanda	32	245	89,8

País	Nº de laboratorios	Nº de 3GCREC	% BLEE
Bulgaria	11	66	90,9
Croacia	14	91	91,2
República Checa	44	387	91,2
Eslovenia	10	107	91,6
Portugal	26	328	92,1
Finlandia	18	263	93,5
Italia	3	33	93,9
Rumanía	11	56	94,6
Luxemburgo	5	22	95,5
Suecia	16	382	97,4
Hungría	7	40	100
Lituania	8	33	100

En los últimos años estamos asistiendo a una serie de cambios en la epidemiología de las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE, mientras que en los años 80 y principios de los 90 la mayoría de las BLEE eran del tipo TEM o SHV, actualmente, las más frecuentes en la mayoría de los países, incluyendo España, son las CTX-M (Cantón y Coque, 2006).

En el estudio epidemiológico llevado a cabo en España en el 2006, en el que se compararon los datos obtenidos ese año con los de otro estudio similar realizado en el año 2000 (Hernández *et al.* 2005), se detectaron cambios muy importantes en la prevalencia y distribución de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE. En ese periodo, pasó del 0,5% (año 2000) al 4,04% (año 2006) y la incidencia de infecciones provocadas por estos microorganismos pasó del 0,12 a 12 (100.000 hab./mes) (Díaz *et al.* 2010). Por otro lado, la prevalencia de las BLEE tipo TEM disminuyó del 19% (año 2000) al 1,2% (año 2006). En cuanto a las BLEE tipo CTX-M, la prevalencia se disparó del 52% en 2000 (CTX-M-9 y CTX-M-14, principalmente) al 72% en 2006 (CTX-M-14, CTX-M-15 y CTX-M-9, principalmente). Y en lo que respecta a la prevalencia de las BLEE tipo SHV, los resultados fueron muy similares en ambos estudios, sin embargo, sí destacaba el aumento de las SHV-12 (Díaz *et al.* 2010).

Posteriormente, Blanco M. y colaboradores (2009), realizaron un estudio epidemiológico en Lugo, en el que se confirmaron las cepas de *E. coli* BLEE CTX-M-15 y CTX-M-14 como las predominantes (54,1% y 21,9%, respectivamente), seguidas de las SHV-12 (9,5%) y CTX-M-32 (6,7%).

Igualmente en los últimos años, distintos estudios hacen referencia a la detección de estas bacterias en diferentes especies animales, tanto en sanos como en enfermos, en ganado vacuno (Madec *et al.* 2008; Wittum *et al.* 2010; Horton *et al.* 2011), en cerdos y en pollos (Blanc *et al.* 2006; Riaño *et al.* 2006), lo que puede representar un problema grave en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en veterinaria.

Al comparar los tipos de BLEE predominantes en bacterias de origen humano en distintos países con los detectados en cepas de origen animal, se evidencia una cierta relación según su distribución geográfica. Así, en España, las CTX-M predominantes en bacterias de origen humano son las del grupo 1 y 9, y en animales sanos destinados a consumo humano las del grupo 9 (Cantón y Coque, 2006; Mamani, 2014). Sin embargo, en países como Dinamarca, Suiza, Portugal y Francia, las cepas CTX-M predominantes en humanos son las de grupo 1, mientras que las cepas CTX-M del grupo 9 raramente son aisladas (Cantón *et al.* 2008; Aarestrup *et al.* 2006; Girlich *et al.* 2007; Goncalves *et al.* 2010). Las CTX-M-15 son las predominantes en humanos en Suiza, mientras que la enzima CTX-M-1 es la más frecuentemente aislada en animales (Geser *et al.* 2012).

1.3.1.2. Grupo clonal ST131

Los primeros estudios epidemiológicos indicaban una ausencia de clonalidad entre las cepas productoras de los distintos tipos de BLEE (Rodríguez-Baño *et al.* 2004), hasta que en el año 2007, y coincidiendo con la diseminación mundial de cepas productoras de CTX-M (especialmente CTX-M-15), un consorcio de investigadores describieron por primera vez un grupo clonal expandido a nivel mundial en hospitales y en la comunidad (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008).

Se trataba del grupo clonal pandémico de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 (de aquí en adelante grupo clonal ST131) que característicamente está asociado a la producción de CTX-M-15, al serotipo O25b:H4, al grupo filogenético B2, y a la secuencia tipo 131 (ST131) (Blanco M. *et al.* 2009).

La introducción y diseminación de este grupo clonal ha hecho cambiar rápidamente el panorama epidemiológico de las BLEE. No obstante, hay que tener en cuenta que menos del 10% de las cepas de este grupo clonal producen BLEE y que su presentación clínica

más frecuente es en forma de resistencia a la ciprofloxacina y sensibilidad a las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación (CipR-noBLEE).

Estudios recientes indican que las cepas del grupo clonal ST131 suponen más del 50% de las cepas productoras de BLEE, al menos 1 de cada 10 infecciones urinarias/sepsis causadas por *E. coli*, y más del 25% de las cepas multirresistentes a los antibióticos a nivel mundial (Blanco M. *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2009a, 2010; Dahbi *et al.* 2013).

A diferencia de la mayoría de las cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos, que derivan principalmente de grupos filogenéticos diferentes del B2 (es decir, A, B1 y D), el grupo clonal ST131 exhibe típicamente múltiples factores de virulencia, incluidas adhesinas, toxinas, sideróforos, cápsulas del grupo 2, etc.; por lo que este grupo clonal combina tanto genes de resistencia como genes de virulencia, algo que en las cepas clásicas del grupo de *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) había sido excluyente (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008).

Recientemente, han sido caracterizados nueve virotipos (A, B, C, D1, D2, D3, D4, D5 y E) dentro del grupo clonal ST131, distribuidos a nivel internacional, con perfiles PFGE específicos y con asociaciones clínico-epidemiológicas significativas. Esta variabilidad dentro de ST131 también se ha demostrado mediante la secuenciación multilocus (MLST) empleando el esquema altamente discriminatorio del Instituto Pasteur, e incluso por serotipado, ya que recientemente se ha observado que algunas cepas del grupo clonal ST131 pertenecen al serotipo O16:H5 (Blanco *et al.* 2013; Mora *et al.* 2014; Dahbi *et al.* 2014). Incluso, ensayos *in vivo* en un modelo murino de sepsis de un grupo representativo de cepas ST131 aisladas de casos clínicos humanos pertenecientes a dos serotipos (O25b:H4, O16:H5) y los nueve virotipos (A, B, C, D1, D2, D3, D4, D5 y E) han demostrado diferentes patrones de virulencia *in vivo* correlacionados con los virotipos ST131 (Mora *et al.* 2014; Dahbi *et al.* 2014).

Los últimos trabajos de investigación indican una alta heterogeneidad dentro del grupo clonal ST131, no solo en base al contenido de genes de virulencia (virotipos), la variedad de enzimas BLEE que puede producir, los patrones de resistencia a antibióticos, los diferentes perfiles de electroforesis en campo pulsado (PFGE), y los diferentes patrones

de virulencia *in vivo*, sino también por las diferencias encontradas entre las cepas obtenidas de distintas fuentes (Mora *et al.* 2010; Platell *et al.* 2011; Johnson *et al.* 2012; Matsumura *et al.* 2012; Dhabi *et al.* 2013; Vredenburg *et al.* 2014).

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE representan actualmente un gran problema, no solo en medicina humana, sino también en veterinaria, con la emergencia de éstas en animales de producción.

El grupo clonal ST131 también ha sido identificado en animales de producción, concretamente en producción aviar (Cortés *et al.* 2010; Mora *et al.* 2010) y producción porcina (LREC, datos no publicados). Cortés y colaboradores (2010) describieron por primera vez el grupo clonal ST131 CTX-M-9, detectándolo en muestras de aves de producción. En ese mismo año, Mora y colaboradores (2010) describen por primera vez la emergencia del grupo clonal O25b:H4-ST131 *ibeA* positivo en cepas aviarias con la reciente adquisición del antígeno capsular K1 incluyendo las cepas productoras de CTX-M-9 y establecen que este grupo clonal representa un riesgo zoonótico real entre humanos y aves.

A lo largo de la historia, la fauna silvestre ha sido una fuente muy importante de transmisión de enfermedades al ser humano. Hoy en día, su papel como reservorio de zoonosis constituye una de las principales preocupaciones en la salud pública (Cutler *et al.* 2010).

Al igual que en otras partes del mundo, las poblaciones de zorros (*Vulpes vulpes*), corzos (*Capreolus capreolus*) y jabalíes (*Sus scrofa*) en España han experimentado tal crecimiento en las últimas décadas que se han extendido prácticamente por toda la Península Ibérica, acercándose a los asentamientos humanos. Esta proximidad potencia el riesgo de contacto entre estas especies silvestres y los animales de producción, así como con el hombre. El noroeste español es una zona típica de ganadería semiextensiva y en las áreas rurales, el contacto entre los animales de producción y los silvestres es inevitable.

La conveniencia de compatibilizar la actividad ganadera con la actividad cinegética-conservacionista en zonas rurales y forestales requiere que las Administraciones

Públicas establezcan estrategias de control, en base a los datos epidemiológicos, que prevengan la posible transmisión de agentes zoonóticos entre los animales que comparten el mismo biotopo.

En un estudio reciente, nuestro grupo demostró que el zorro, el corzo y el jabalí en Galicia se confirman como reservorios de *E. coli* enterohemorrágicos productores de verotoxinas potencialmente patógenos para el ser humano y que parecen jugar un papel importante en su mantenimiento y transmisión (Mora *et al.* 2012).

Los animales silvestres no están normalmente expuestos a los agentes antimicrobianos utilizados en la clínica, pero pueden adquirir bacterias resistentes a antimicrobianos a través del contacto con humanos, animales domésticos y el medio ambiente, en el que parece que las aguas contaminadas con heces son el vector más importante (Colomer-Lluch *et al.* 2013).

La diseminación a nivel mundial de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en el medio ambiente, más allá del perímetro de las poblaciones humanas y de producción animal, parece estar directamente influenciado por la práctica mediante el uso de antimicrobianos. Esto podría ser la consecuencia colateral de la emergencia de infecciones comunitarias por cepas BLEE, pero a su vez puede dar lugar a:

a) Una subsiguiente colonización de las poblaciones de animales silvestres, que a su vez se conviertan en fuentes de infección o incluso en un reservorio de *E. coli* productoras de BLEE.

b) Diseminación y transmisión de *E. coli* productoras de BLEE en nichos ecológicos frágiles.

c) Posibles nuevos ciclos de infección entre los animales silvestres, animales domésticos y los humanos.

d) Problemas en el tratamiento médico de todas las especies.

En este sentido, los investigadores señalan la necesidad de estudios a gran escala, en particular estudios centinela, para monitorizar el impacto de la diseminación de este

tipo de bacterias multirresistentes en la fauna silvestre (Guenther *et al.* 2011).

Actualmente se conoce que las aves silvestres son portadoras, con una alta prevalencia, de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (incluidas cepas del grupo clonal ST131) y se asume que este fenómeno es debido al contacto frecuente con aguas residuales humanas y a los residuos procedentes de las granjas de producción intensiva. También se ha sugerido que las aves migratorias juegan un papel importante en la transmisión y mantenimiento de este tipo de cepas (Guenther *et al.* 2012).

A día de hoy, se asume que las aguas residuales humanas y los residuos de las granjas de producción intensiva juegan un papel fundamental en el mantenimiento y diseminación de cepas productoras de BLEE y del grupo clonal ST131 (Guenther *et al.* 2011; Colomer-Lluch *et al.* 2013).

1.3.2. *E. coli* diarreagénicos

Las enfermedades diarreicas son la mayor causa de mortalidad y morbilidad entre los niños menores de 5 años, contando en más de 718.000 el número de muertes y en 1.731 millones de casos al año, con una incidencia de 2,7 episodios de diarrea por niño al año en 2011 (Walker *et al.* 2013).

La prevalencia de los distintos patógenos entéricos varía entre los distintos países y áreas geográficas (Afset *et al.* 2003; Cohen *et al.* 2005; Spano *et al.* 2008; Ochoa *et al.* 2009; Moyo *et al.* 2011; Sang *et al.* 2012). Los grupos de *E. coli* diarreagénicos han adquirido gran relevancia en los últimos años en cuanto a la salud pública se refiere (Okeke, 2009; Estrada-García y Navarro-García, 2012; Croxen *et al.* 2013; Dutta *et al.* 2013; Chattaway *et al.* 2013).

Los *E. coli* diarreagénicos se clasifican en 6 categorías en función de sus características clínicas, epidemiológicas y factores de virulencia: *E. coli* enterotoxigénicos (ECET), *E. coli* enteropatógenicos (ECEP), *E. coli* enteroinvasivos (ECEI), *E. coli* enteroagregativos (ECEA), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) también conocidos como Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC) (Tabla 6) (Nataro y Kaper, 1998).

Tabla 6. Factores de virulencia de *E. coli* diarreagénicos humanos (Blanco *et al.* 2002, cap. 21)

<i>E. coli</i> enteropatógenos (ECEP)
<ul style="list-style-type: none"> • Adhesina BFP codificada en el plásmido EAF responsable de la adhesión a distancia de la bacteria al enterocito y de la adhesión localizada a células HEp-2. • Locus cromosómico LEE con los genes: <i>ea</i>e, <i>tir</i>, <i>esp</i> y <i>sep</i>. Responsable de la adhesión íntima de la bacteria y de la lesión de adhesión y borrado del <i>microvilli</i> intestinal.
<i>E. coli</i> enterotoxigénicos (ECET)
<ul style="list-style-type: none"> • Factores antigénicos de colonización (CFA/I, II, III y IV). • Enterotoxinas: termolábil LT y termoestable STa. • Tanto los CFAs como las enterotoxinas se encuentran codificadas en plásmidos.
<i>E. coli</i> enteroinvasivos (ECEI)
<ul style="list-style-type: none"> • Plásmido de elevado peso molecular (140 MDa) que lleva genes implicados en la invasividad.
<i>E. coli</i> verotoxigénicos (ECVT) o enterohemorrágicos (ECEH)
<ul style="list-style-type: none"> • Verotoxinas (VT1 y VT2) o shiga-like toxins (Stx1 y Stx2) codificadas en profagos. • Locus cromosómico LEE con genes: <i>ea</i>e, <i>tir</i>, <i>esp</i> y <i>sep</i>. • Plásmido de 60 Mda que codifica para una enterohemolisina (E-Hly) y una adhesina fimbrial que puede estar implicada en la colonización intestinal.
<i>E. coli</i> enteroagregativos (ECEA o ECEAgg)
<ul style="list-style-type: none"> • Adhesión agregativa a células HEp-2 mediada por las fimbrias plasmídicas AAF/I y AAF/II • Enterotoxina termoestable EAST1 (plasmídica). • Citotoxina de 108 KDa que provoca lesiones destructivas a nivel intestinal.
<i>E. coli</i> con adherencia difusa (ECAD)
<ul style="list-style-type: none"> • Adhesión difusa a células HEp-2 mediada por la fimbria F1845 • Proteína de la membrana externa de 100 Kda denominada AIDA-I.

A diferencia de las cepas comensales y de las ExPEC, las cepas de *E. coli* diarreagénicas raramente aparecen en la microbiota fecal de hospedadores sanos y además, al contrario de las cepas ExPEC, las diarreagénicas parecen ser esencialmente patógenas obligadas, causando distintas infecciones entéricas cuando son ingeridas en cantidades suficientes (Russo y Johnson, 2000).

Las cepas de los diferentes grupos de *E. coli* diarreagénicos pertenecen a una amplia variedad de serotipos. En la Tabla 7 se relacionan los más frecuentes en humanos.

Tabla 7. Principales serotipos de *E. coli* diarreagénicos humanos (Herrera, 2010)

ECEP	ECET	ECEI	ECVT	ECEA
Clásicos	O6:H16,H51,H-	O28:H-	O1:H7,H-	O3:H2,H3,H21
O26:H11,H-	O8:H9,H-	O29:H-	O2:H5	O4
O55:H6,H51,H-	O9:H21	O73:H18	O8:H2,H-	O7:H-
O86:H8,H34,H-	O11:H27	O112:H-	O9:H21	O9:H10
O111:H2,H6,H27,H-	O15:H11,H-	O115:H-	O15:H-	O15:H1,H18,H-
O114:H2,H-	O20:H21,H-	O121:H-	O22:H8	O17:H18
O119:H2,H6,H8,HH-	O25:H42,H-	O124:H7,H30,H-	O25:H-	O21:H21
O125	O27:H7,H20,H-	O135:H-	O26:H11,H-	O25:H9,H18,H19
O126:H2	O29:H-	O136:H-	O55:H-	O44:H18
O127:H6,H40,H-	O49:H-	O143:H-	O76:H19	O51:H11
O128:H2	O63:H12,H-	O144:H25,H-	O77:H41	O77:H18

ECEP	ECET	ECEI	ECVT	ECEA
O142:H6,H21,H34	O77:H18,H45	O152:H-	O84:H2	O78:H2,H10
	O78:H11,H12,H-	O153:H-	O91:H14,H21,H-	O85:H10
Otros	O85:H7	O159:H2,H-	O98:H-	O86:H2,H11,H18
O2:H2,H45	O114:H21,H49,H-	O164:H-	O103:H2,H7,H25	H21,H27
O23:H8	O115:H21,H40,H51	O167:H4,H5,H-	O104:H21	O92:H33
O26:H-	O126:H9	O171:H-	O111:H2,H8,H-	O104:H?
O33:H34	O128:H7,H12,H21,H27,H4,H9	O173:H-	O113:H4,H21,H32	O111:H21
O34:H45	O139:H28		O117:H4,H7	O125:H9,H21
O49:H10	O148:H8,H28		O118:H2,H12,H16	O127:H2
O51:H49	O149:H4,H10		O121:H19	O153:H2
O73:H34	O153:H45		O128:H2,H-	ONT:H10,H21,H-
O76:H51	O159:H4,H20,H21,H34,H-		O129:H-	
O88:H21,H25	O166:H27		O145:H28,H-	
O101:H33	O167:H5		O146:H21,H28	
O107:H-	O169:H41,H-		O150:H-	
O109:H-	O173:H-		O153:H21,H33,H-	
O110:H6			O157:H7,H-	
O118:H5			O165:H25	
O131:H46			O166:H28	
O145:HNT			O174:H-	
O148:H28			ONT:H8,H19,H21,H-	
O153:H7,H8,H11				
O157:H45,H-				
O162:H33,H-				
O167:H6				
OX9:H7				
ONT:H7,H45				

En la tabla figuran los diferentes antígenos H asociados a cada antígeno O. Así O26:H11,H- son realmente dos serotipos (O26:H11 y O26:H-).

1.3.2.1. *E. coli* enterotoxigénicos (ECET)

Los *E. coli* enterotoxigénicos fueron descritos por primera vez como causantes de diarrea en ganado porcino (Alexander, 1994), en el que sigue provocando importantes pérdidas económicas en neonatos y recién destetados (Melkebeek *et al.* 2013). Pero no fue hasta 1971 cuando DuPont y colaboradores demostraron que las cepas de ECET eran capaces de causar diarrea en humanos adultos voluntarios.

Los ECET son considerados en la actualidad, junto con los *E. coli* enteropatógenos (ECEP) y los rotavirus, los patógenos que con mayor frecuencia causan gastroenteritis infantil, diarrea colérica y diarrea del viajero en países con condiciones higiénico-sanitarias deficientes (OMS, 2005). En estudios realizados en Asia, África e Iberoamérica,

los ECET se aíslan de entre el 10% y el 50% de los pacientes con diarrea. En los países desarrollados, los ECET se aíslan muy raramente de casos esporádicos de diarrea (0%-4%). Se cree que la razón de que los ECET causen diarrea principalmente en países poco desarrollados es que las bacterias deben ser ingeridas en cantidades elevadas (10^8 - 10^{10}) para llegar a provocar deshidratación. Concentraciones tan elevadas de bacterias fecales solo se dan cuando las condiciones higiénico-sanitarias son deficientes. No obstante, aún en los países desarrollados han de controlarse los ECET, ya que en los últimos años han provocado algunos brotes de gastroenteritis en EE.UU y Noruega (Yoder *et al.* 2006; Harrison *et al.* 2012; MacDonald *et al.* 2015). Los síntomas más destacados de las enfermedades causadas por los ECET son diarrea y calambres abdominales, algunas veces acompañados por náuseas y dolor de cabeza, normalmente con vómitos o fiebre. Al mismo tiempo, también se asocian con diarreas líquidas moderadas, y algunos brotes han llamado la atención por su prolongada duración.

Los ECET humanos colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pili o fimbrias denominadas factores de colonización intestinal CFA (*colonization factor antigens*) (CFA/I, CFA/II, CFA/III o CFA/IV), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de dos enterotoxinas: termolábil (LT) y/o termoestable (ST) (Figura 3).

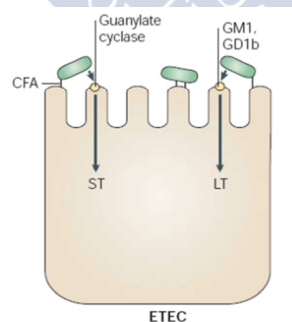


Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de los ECET (Kaper *et al.* 2004)

- La enterotoxina termolábil LT (Heat-labile) de *E. coli* está íntimamente relacionada en estructura y función a la enterotoxina del cólera (CT) expresada por la *Vibrio cholerae* (Sixma *et al.* 1993).
- Existen dos tipos de enterotoxinas termorresistentes ST (Heat Stable), que difieren en estructura y mecanismo de acción. Por un lado, la toxina STa que se asocia con cepas ECET

humanas, porcinas y de rumiantes y, por otro, la toxina STb, que se asocia fundamentalmente con cepas aisladas del ganado porcino. En España los serotipos predominantes entre humanos son O25:H- (STa CFA/III), O153:H45 (STa CFA/I), O169:H41 o H- (STa CFA/IV) (Blanco *et al.* 1991, 2002).

En animales, se sabe que en rumiantes las infecciones por ECET generan grandes pérdidas económicas debidas a las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad que produce (Cox *et al.* 2014). En ganado vacuno y ovino, las infecciones por ECET en los primeros 4 días de vida, pueden ser las responsables de diarreas graves con altos índices de mortalidad (Nagy y Fekete, 1999). En lechones neonatales y recién destetados, las diarreas asociadas a ECET provocan altas tasas de mortalidad y morbilidad (Gyles, 1994) y están consideradas una de las enfermedades más importantes a nivel económico en la cría de ganado porcino (Van den Broeck *et al.* 1999; Frydendahl, 2002; Chen *et al.* 2004).

Los ECET que causan diarrea en animales producen enterotoxinas (LT, STa y/o STb) y poseen los factores de colonización K88, K99, P987, F18 o F41 (Garabal *et al.* 1995, 1996; González *et al.* 1995; Blanco M. *et al.* 1997b; Vu Khac *et al.* 2006, 2007). Las fimbrias asociadas con diarreas en cerdos son F4 (K88), F5 (K99), F6 (P987); F7 (F41) y F18. No obstante, en ganado vacuno las fimbrias identificadas con mayor frecuencia son K99, F41 y F17 (Casey *et al.* 1992; Nagy y Fekete, 1999; Nguyen *et al.* 2011), mientras que en corderos son K99 y F41 (Nagy y Fekete, 1999).

1.3.2.2. *E. coli* enteroinvasivos (ECEI)

Los ECEI son muy parecidos desde el punto de vista bioquímico, genético y por sus mecanismos de patogenicidad, a los miembros del género *Shigella*. De hecho, estudios recientes de evolución molecular apoyan la teoría del multiorigen de las diferentes especies de *Shigella* a partir de la adquisición por distintos serotipos de *E. coli* de diversos plásmidos de virulencia ancestrales (Yang *et al.* 2007).

Los primeros estudios que demostraron la capacidad de los ECEI de provocar diarreas al invadir las células del epitelio intestinal, fueron realizados por Dupont y colaboradores en 1971. Los genes que confieren el potencial invasor están localizados en un plásmido (plnv) de 120 MDa en *Shigella sonnei* y en un plásmido de 140 MDa en las otras especies

de *Shigella* y en *E. coli*. Además, los ECEI producen una enterotoxina de 63 kDa (ShET2) que se encuentra codificada en el gen plasmídico *sen*.

Existe un número reducido de serotipos de ECEI, siendo el más frecuente el serotipo O124:H- que en España ha causado varios brotes (Nataro y Kaper 1998; Andrade *et al.* 2002; Kaper *et al.* 2004), y el serotipo, el O73:H18 responsable de otro brote que ha tenido lugar en nuestro país (Blanco *et al.* 2002).

El mecanismo de patogénesis de los ECEI comprende los siguientes pasos: (1) penetración por endocitosis al interior de las células de la mucosa del colon, (2) lisis de la vacuola endocítica, (3) multiplicación intracelular, (4) movimiento intracelular y (5) diseminación lateral a las células adyacentes (Figura 4).

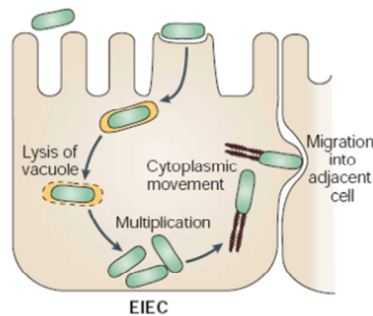


Figura 4. Esquema del ciclo de infección de los ECEI. Las bacterias penetran por endocitosis en las células de la mucosa del colon y luego se diseminan (Kaper *et al.* 2004)

Esta secuencia de eventos provoca, en la mayoría de los pacientes afectados, diarrea acuosa y solamente algunos presentan disentería, que se manifiesta con sangre, mucus, leucocitos en heces y fiebre. Cuando la infección es grave, puede aparecer una fuerte inflamación que se manifiesta en forma de úlceras (Nataro y Kaper, 1998).

1.3.2.3. *E. coli* enteroagregativos (ECEA)

Hasta principios de los años ochenta, las cepas de *E. coli* inductoras de diarrea estaban clasificadas en tres categorías: ECET, ECEI y ECEP. Sin embargo, más tarde se encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea que no se podían englobar en ninguno de los tres grupos conocidos hasta entonces. Dichas cepas poseían un patrón de adherencia caracterizado por agregación de las bacterias entre sí de manera inespecífica en una configuración “en ladrillo”, lo que permitió la diferenciación de un nuevo grupo

de *E. coli* diarreagénicos: los *E. coli* enteroagregativos ECEA (Nataro y Kaper, 1998; Okeke y Nataro, 2001).

En países en vías de desarrollo, los ECEA (o ECEAgg) se han asociado con la diarrea infantil, y están particularmente asociados con la diarrea persistente de más de 14 días de duración.

En países desarrollados no se ha estudiado sistemáticamente, pero se sabe que se aíslan con frecuencia en niños y adultos con diarrea, que han provocado algunos brotes importantes y que pueden estar implicados en las diarreas crónicas que sufren pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Provocan una diarrea acuosa mucoide, pero se puede observar la presencia de sangre en un número significativo de muestras fecales, a pesar de esto, son frecuentes los individuos portadores asintomáticos (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas de ECEA presentan fimbrias (AAF/I y AAF/II) que les permiten adherirse de forma agregativa a las células HEp-2 y al epitelio intestinal. Una vez unidas, las cepas provocan un aumento de la secreción de moco que conduce a la formación de una biopelícula en la superficie del intestino delgado en la que quedan atrapadas las bacterias. Si examinamos esta película mucoide podemos ver la presencia de un gran número de bacterias agregadas y densamente

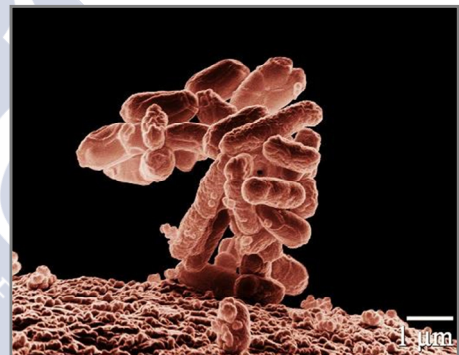


Figura 5. *E. coli* enteroagregativo (USDA, www.ars.usda.gov/is/graphics/photos/mar05/K11077-1.htm)

empaquetadas (Figura 5). Se cree que la formación de la biopelícula puede facilitar la colonización persistente y, tal vez, una mala absorción. Posteriormente, la bacteria produce una enterotoxina termoestable (EAST1) de 4.100 Da y una citotoxina de 108 kDa que pueden ser responsables de la diarrea y de las lesiones histopatológicas (acortamiento de las microvellosidades o villi). La enterotoxina EAST1 y los factores de colonización AAF/I y AAF/II se encuentran codificados en plásmidos (Nataro y Kaper, 1998; Okeke y Nataro, 2001) (Figura 6).

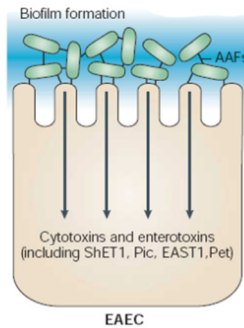


Figura 6. Mecanismos de patogenicidad de los ECEA (Kaper *et al.* 2004)

Los serotipos de ECEA que predominan en España son: O3:H2, O15: H- y O86:H21 o H27 (Blanco *et al.* 2002).

La detección de los ECEA se realiza investigando la adhesión agregativa a células HEp-2 y mediante pruebas genéticas (hibridación o PCR) que detectan un plásmido (pCVD432) asociado con el patrón de adherencia enteroagregativa (Nataro y Kaper, 1998; Pabst *et al.* 2003; Piva *et al.* 2003; Kaper *et al.* 2004; Sarantuya *et al.* 2004; Blanco M. *et al.* 2005; Cohen *et al.* 2005; Nataro, 2006).

1.3.2.4. *E. coli* enteropatogénicos (ECEP)

Durante décadas, los mecanismos de patogenicidad de los ECEP eran desconocidos y solo podían ser identificados mediante serotipado. No obstante, desde 1979 se han realizado numerosos avances en la comprensión de la patogénesis de las diarreas provocadas por cepas ECEP (Kaper *et al.* 2004).

El serotipado sistemático de las cepas *E. coli* aisladas de casos esporádicos y brotes de diarrea en Europa y Estados Unidos (EE.UU.), permitió en los años cuarenta y cincuenta del pasado siglo, asociar con la diarrea infantil un grupo de cepas *E. coli* pertenecientes a un grupo limitado de serotipos que se denominaron *E. coli* enteropatogénicos (ECEP) (Neter *et al.* 1953a, 1953b, 1955; Neter, 1955). Posteriormente, la OMS reconocería que los ECEP englobaban cepas pertenecientes a 12 serogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 y O158 (OMS, 1987), también conocidos como serogrupos clásicos de ECEP.

Varios estudios realizados con voluntarios en la década de los cincuenta demostraron

que estas cepas eran capaces de producir diarrea. Sin embargo, en los años setenta se descubrió que las ECEP no producían enterotoxinas ni tenían capacidad enteroinvasiva, por lo que algunos investigadores concluyeron precipitadamente que dichas cepas no eran enteropatógenas. La polémica suscitada fue resuelta por Levine y colaboradores en 1978 al demostrar, tras la inoculación oral a voluntarios, que las cepas ECEP, no enterotoxigénicas ni enteroinvasivas, conservadas en el laboratorio durante más de siete años, todavía eran capaces de causar diarrea por mecanismos no conocidos.

Los ECEP son hoy en día una de las principales causas de diarrea en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo, predominando especialmente los serotipos O111:H2 y O119:H6. La mayor prevalencia se da en lactantes de hasta seis meses (Donnenberg *et al.* 1997; Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.* 2004).

Una de las principales características de la infección por ECEP es la diarrea de tipo acuoso, que puede ocurrir en diversos grados de intensidad. Además es común que los niños infectados presenten vómito y fiebre moderada. El periodo de incubación varía de 3 a 24 h después de que el individuo ingiere en condiciones experimentales un inóculo de bacterias (10^9 a 10^{10} UFC), aunque se cree que el inóculo que infecta de manera natural a los niños es mucho menor (Cravioto *et al.* 1988; Nataro y Kaper, 1998).

La característica histopatológica asociada con los ECEP y que los define es la denominada **“attaching and effacing” (A/E)** (adhesión y borrado), la bacteria queda íntimamente adherida a las células del epitelio intestinal provocando cambios importantes en el citoesqueleto, incluyendo la acumulación de actina polimerizada directamente debajo de las bacterias adheridas. La reorganización del citoesqueleto altera la morfología y fisiología normal de la región apical de las células, lo que lleva al final a la pérdida de las microvellosidades intestinales y su función (Finlay *et al.* 1992; Goosney *et al.* 2000). Además, se forma desde el epitelio intestinal una estructura tipo pedestal en la que se posan las bacterias (Figura 7).

La capacidad de inducir esta histopatología (A/E) está codificada por genes que se encuentran en una isla de patogenicidad de 35 kb denominada isla de patogenicidad LEE (Locus of enterocyte effacement). La isla de patogenicidad LEE también se encuentra en

patógenos humanos y animales que producen la histopatología A/E, incluidos ECVT y ECEP implicados en patología cunícola, y en *Citrobacter rodentium*, que induce hiperplasia colónica en ratones (Kaper *et al.* 2004).

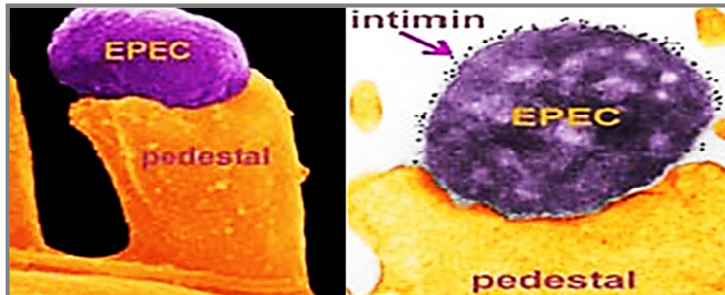


Figura 7. ECEP adherido a la estructura de tipo pedestal (Gad Frankel, Imperial College London, <http://www.imperial.ac.uk/people/g.frankel/reseacrh.html>)

En 1992, Donnenberg y Kaper describieron el mecanismo de patogenicidad de los ECEP en un modelo de tres etapas (adherencia a distancia, transducción de señales e íntima adherencia), en el que aparecen múltiples pasos en la producción de la lesión A/E. La adherencia es un proceso fundamental en la patogénesis y en ella se pueden distinguir dos fases, por un lado la adherencia a distancia de la bacteria al enterocito, y por otro, la adherencia íntima (Figura 8).

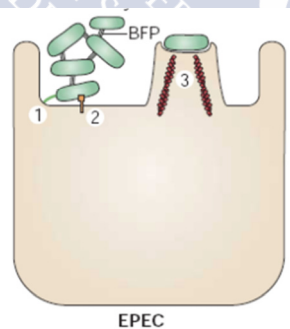


Figura 8. Mecanismo de patogenicidad de los ECEP (Kaper *et al.* 2004)

La isla de patogenicidad LEE codifica para los componentes estructurales de un sistema de secreción tipo III (T3SS), reguladores, translocadores, chaperones y moléculas efectoras que alteran diversos procesos celulares (Garmendia *et al.* 2005). La isla LEE también codifica para una proteína de la membrana externa de 94 kDa denominada **intimina**, que media la adherencia íntima de la bacteria al enterocito (Kaper *et al.* 2004). Concretamente, la intimina está codificada por el gen *eae* (*E. coli* attaching and effacing),

localizado en el operón LEE₅ de la isla de patogenicidad LEE. Este gen *eae* está presente en todas las cepas ECEP y ECVT capaces de producir una lesión A/E.

El gen *eae*, tiene una región C-terminal (3') altamente variable (280 aminoácidos) que codifica para la parte de la proteína que interacciona directamente con el receptor Tir. Por el contrario, la región N-terminal es muy conservada, ello favorece enormemente los estudios sobre el gen *eae*, ya que por una parte, es posible establecer unos primers basados en la región variable del gen, que sirvan para diferenciar las distintas variedades, y por otra, es posible también diseñar primers basados en la región conservada, que sirvan para detectar conjuntamente todas las variantes del gen *eae*. Hasta el día de hoy se han descrito 34 tipos y subtipos de intiminas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ , $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, $\epsilon 5$, $\zeta 1$, $\zeta 2$, $\zeta 3$, ν , $\eta 1$, $\eta 2$, $\theta 1$, $\theta 2$, $\iota 1A$, $\iota 1B$, $\iota 1C$, $\iota 2$, υ , κ , λ , μ , \omicron , π , τ , ρ y σ (Adu-Bobie *et al.* 1998; Oswald *et al.* 2000; Tarr y Whittam, 2002; Zhang *et al.* 2002; Blanco M. *et al.* 2003a, 2004b, 2005, 2006a ; Garrido *et al.* 2006; Mora *et al.* 2009a; Horcajo *et al.* 2012). La diferenciación de los alelos que codifican para los distintos tipos de intiminas es importante para el diagnóstico, la epidemiología y el establecimiento de las relaciones clonales de los ECVT y los ECEP, así como para los estudios inmunológicos y el desarrollo de vacunas.

El grupo de los ECEP presenta factores de virulencia adicionales codificados fuera de la isla de patogenicidad LEE. Algunas cepas de ECEP poseen un plásmido de 70-100 kb denominado pEAF (EPEC adherence factor) (Tobe *et al.* 1999). Este plásmido codifica para un pilus tipo IV denominado BFP (Bundle-forming pilus) que es el responsable de mediar la adherencia entre bacterias y la adherencia de las bacterias a las células epiteliales (Giron *et al.* 1991). También contiene el locus *per* (plasmid-encoded regulator), cuyos productos regulan el operón *bfp* y la mayoría de los genes de la isla LEE mediante el Ler (LEE encoded regulator) (Kaper *et al.* 2004).

En 1995, los ECEP fueron divididos en dos grupos, los ECEP típicos (ECEPt) y los ECEP atípicos (ECEPa). La diferencia básica entre ambos es la presencia del pEAF en ECEPt y su ausencia en ECEPa (Kaper, 1996). Trabulsi y colaboradores (2002) describieron muchas otras diferencias entre ambos grupos. De hecho, aunque la mayoría de los estudios han identificado los serogrupos clásicos entre los ECEPa, en los últimos años se han descrito muchas cepas ECEPa pertenecientes a una amplia variedad de serogrupos (Hernandes *et*

al. 2009; Blanco M. *et al.* 2006a, 2006b). En cuanto al genotipo, las cepas de ECEPa presentan con mayor frecuencia genes de virulencia de otros patotipos diarreagénicos en relación con los ECEPt (Trabulsi *et al.* 2002; Vieira *et al.* 2001; Beutin *et al.* 2005; Scaletsky *et al.* 2009; Horcajo *et al.* 2012), lo que da una idea de su heterogeneidad. Gomes y colaboradores (2004) demostraron que las cepas ECEPa pertenecientes a serogrupos no clásicos presentan incluso más diversidad. Estudios epidemiológicos y experimentales apoyan la hipótesis de que al menos algunos ECEPa podrían proceder de ECVT que han perdido sus genes *vt* (Afset *et al.* 2008; Scaletsky *et al.* 2009; Horcajo *et al.* 2012).

Mientras que los ECEPt están claramente relacionados con diarrea en niños menores de 1 año y son la principal causa de diarrea endémica en países del tercer mundo (Toledo *et al.* 1983; Gomes *et al.* 1991; Trabulsi *et al.* 2002), existen datos controvertidos con respecto a la asociación epidemiológica de los ECEPa como agentes causales de diarrea. Algunos estudios epidemiológicos sugieren una creciente identificación de ECEPa en casos de diarrea, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Trabulsi *et al.* 2002), y aunque algunos estudios han demostrado la asociación entre este tipo de cepas y la diarrea infantil (Araujo *et al.* 2007), otros describen los ECEPa como agentes de diarrea persistente (Afset *et al.* 2004; Nguyen *et al.* 2006). La detección de cepas ECEPa en pacientes con diarrea de distintos rangos de edad y en pacientes con SIDA es indicativo de que algunas cepas ECEPa con ciertas combinaciones genéticas actúan como verdaderos enteropatógenos (Gassama-Sow *et al.* 2004; Gomes *et al.* 2004). En diferentes países se han descrito además brotes en los que aparecen implicados como agentes causales de diarrea cepas ECEPa pertenecientes a diferentes serogrupos/serotipos tales como O39:HNM (Hedberg *et al.* 1997), O111 (Viljanen *et al.* 1990), O55:HNM (Yatsuyanagi *et al.* 2002), ONT:H45 (Yatsuyanagi *et al.* 2003).

En España, los ECEPa parecen ser un grupo emergente, ya que la frecuencia con la que se aíslan estas cepas ha aumentado en los últimos años. Este hecho queda evidenciado en los estudios realizados por el LREC entre 1996-1999 en colaboración con la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA), en los que se examinó la prevalencia de los diferentes tipos de *E. coli* diarreagénicos en coprocultivos de

pacientes con diarrea y otras alteraciones gastrointestinales. Mientras que los ECEPt se aislaron únicamente en 5 de los 2.015 pacientes estudiados (0,2%), los ECEPa se identificaron en 105 (5,2%) (Tabla 8 y Tabla 9) (Blanco M. *et al.* 2006a).

Tabla 8. Prevalencia de *E. coli* diarregénicos en coprocultivos de pacientes del HULA (1996-1999) (Blanco M. *et al.* 2006a)

Enteropatógeno bacteriano	N° total de muestras	N° de muestras positivas
ECEP típico <i>eae</i> ⁺ <i>bfp</i> ⁺	2.015	5 (0,2%)
ECEP atípico <i>eae</i> ⁺ <i>bfp</i> ⁻	2.015	105 (5,2%)
ECVT (STEC)	3.212	90 (2,8%)
ECET	2.467	17 (0,7%)
ECEI	2.467	6 (0,2%)
ECEA	2.467	51 (2,1%)

Tabla 9. Tipos y subtipos de intiminas encontrados en ECEPt y ECEPa de origen humano (Lugo, 1996-1999) (Blanco M. *et al.* 2006a)

Tipo de intimina	N° de cepas	Serotipos (N° de cepas)
EPEC típicos (<i>eae</i>⁺ <i>bfpA</i>⁺ <i>vt1</i>⁻ <i>vt2</i>⁻) (n=5)		
α1	3	O131:H46 (1), O157:H45 (2)
ξR/β2	1	O167:H6 (1)
ι1	1	O153:H8 (1)
EPEC atípicos (<i>eae</i>⁺ <i>bfpA</i>⁻ <i>vt1</i>⁻ <i>vt2</i>⁻) (n = 105)		
α1	3	O51:H49 (3)
α2	4	O63:H33 (1), O125:H6 (1), O132:H1 (1), O132:H34 (1)
β1	34	O4:H16 (2), O6:H1 (1), O11:H16 (1), O15:H2 (1), O26:H- (5), O26:H11 (3), O49:H2 (1), O51:H- (1), O51:H19 (1), O51:H49 (2), O80:H26 (1), O103:H- (2), O115:H8 (2), O128:H2 (3), O145:H10 (2), O153:H7 (1), O167:H9 (1), O177:H- (1), O177:H11 (2), ONT:H2 (1)
ξR/β2	5	O56:H6 (1), O110:H6 (1), O113:H6 (2), O137:H6 (1)
δ/κ	5	O49:H- (1), O71:H49 (1), O88:H- (2), ONT:H- (1)
γ1	13	O55:H11 (1), O145:H28 (4), O145:H- (8)
γ2/θ	16	O2:H40 (1), O5:H11 (1), O10:H- (2), O11:H25 (1), O51:H40 (2), O71:H40 (2), O76:H7 (1), O103:H40 (1), O111:H25 (1), O117:H40 (1), O153:H- (1), O159:H4 (1), ONT:H- (1)
ε1	9	O26:H- (1), O45:H40 (1), O80:H26 (1), O103:H2 (1), O140:H31 (1), O152:H38 (2), O157:H16 (1), ONT:H16 (1)
νR/ε2	5	O6:H19 (1), O123:H19 (4)
ζ	6	O85:H31 (1), O85:H- (1), O85:HNT (1), O156:H25 (1), O156:H- (1), O179:HNT (1)
μR/ι2	1	ONT:H45 (1)
νB	1	O10:H- (1)
ξB	1	O80:H2 (1)
ο	2	O84:H- (1), O129:H- (1)

En un segundo estudio realizado en el periodo 2005-2013 se detectó un incremento significativo de las infecciones causadas por los ECEP, pasando los ECEPt de un 0,2% a un 0,6% y los ECEPa de un 5,2% a un 11,5%, lo que apoya la hipótesis de los ECEPa como grupo emergente (Tabla 10 y Tabla 11) (López *et al.* 2007; LREC, datos no publicados).

Tabla 10. Prevalencia de *E. coli* diarregénicos en coprocultivos de pacientes del HULA (2005-2013) (López *et al.* 2007; LREC, datos no publicados)

Enteropatógeno bacteriano	N° de muestras positivas
ECEP típico <i>eae</i> ⁺ <i>bfp</i> ⁺	63 (0,6%)
ECEP atípico <i>eae</i> ⁺ <i>bfp</i> ⁻	1.309 (11,5%)
ECVT (STEC)	282 (2,5%)
ECET	91 (0,8%)
ECEI	17 (0,1%)
ECEA	198 (1,7%)

Tabla 11. Tipos y subtipos de intiminas encontradas en ECEPt y ECEPa de origen humano (Lugo, 2003-2005) (López *et al.* 2007; LREC, datos no publicados)

Tipo de intimina	N° de cepas	Serotipos (N° de cepas)
ECEP típicos (<i>eae</i>⁺ <i>bfpA</i>⁺ <i>vt</i>⁻) (n=6)		
δ/κ	3	O49:H10 (2), O88 (1)
νR/ε2	2	O88:H25 (2)
ι1	1	O153:H11 (1)
ECEP atípicos (<i>eae</i>⁺ <i>bfpA</i>⁻ <i>vt</i>⁻) (n=190)		
α1	4	O1:H49 (1), O51:H41 (1), O51:H49 (2)
α2	11	O5:H6 (1), O20:H6 (1), O63:H6 (4), O101:H- (1), O132:H5 (2), O132:H34 (2)
β1	47	O1:H7 (1), O2:H16 (1), O8:H11 (1), O8:H19 (1), O11:H16 (1), O15:H2 (7), O15 (3), O18:H7 (1), O21:H15 (1), O24:H2 (1), O25:H2 (1), O26:H11 (3), O49:H2 (1), O51:H40 (1), O51:H- (1), O103:H2 (1), O103:H4 (1), O111:H- (1), O115:H8 (4), O128:H2 (2), O128:H- (1), O139:H2 (1), O153:H8 (1), O159:H2 (1), O167:H9 (1), O167:H11 (1), O177:H11 (1), O178:H7 (1), ONT:H10 (1), ONT:H11 (3), ONT:H- (1)
ξR/β2	26	O3:H4 (1), O33:H6 (1), O56:H6 (1), O56:H- (1), O110:H10 (1), O112:H15 (1), O113:H6 (3), O121:H19 (1), O137:H6 (3), O139:H19 (1), O168:H- (1), O178:H6 (1), O184 (1), ONT:H4 (1), ONT:H6 (5), ONT:H8 (1), ONT:H9 (1), ONT:HNT (1)
β3	2	O128:H- (1), ONT:H4 (1)
δ/κ	7	O2:H45 (1), O5:H49 (1), O49:H10 (1), O49:H- (2), O85:H8 (1), ONT:H4 (1)
γ1	21	O55:H7 (3), O145:H28 (3), O145:H- (8), O145 (1), O157:H7 (3), ONT:H- (1), ONT:HNT (2)
γ2/θ	33	O2:H40 (7), O10:H- (1), O15:H7 (1), O64:H40 (1), O71:H1,H12 (1), O98:H- (1), O103:H40 (1), O117:H11 (1), O117:H40 (1), O127:H40 (3), O146:H28 (1), O153:H31 (1), O153:H40 (1), O156:H4 (1), O156:H8 (3), O162:H- (1), O174 (1), ONT:H11 (1), ONT:H23 (1), ONT:H40 (1), ONT:H- (3)
ε1	11	O1:H40 (1), O18:H16 (1), O26:H2 (1), O26:H11 (1), O113:H- (1), O123:H45 (1), O153:H11 (1), O157:H16 (1), O171:H19 (1), ONT:H40 (1), ONT:H45 (1)
ε3	3	O85:H43 (1), O181:H- (1), ONT:H- (1)
ε4	1	O109:H- (1)
ζ	8	O64:H25 (1), O85:H- (1), O85:H31 (3), O86:HNT (1), O156:H- (1), O179:H31 (1)
η2	1	ONT:H45 (1)
μR/ι2	1	O101:H- (1)
λ	1	O33:H34 (1)
ξB	7	O2:H6 (1), O4:H- (1), O6:H16 (1), O80:H2 (4)
ο	4	O35:H11 (1), O84:H- (1), O105:H4 (1), ONT:H- (1)
π	1	ONT:H51 (1)
ρ	1	O180:H2 (1)

Los ECEP también están implicados en procesos diarreicos en los animales. Son patógenos importantes en las explotaciones producción cunícola, en las que causan graves pérdidas económicas (Peeters, 1993; Blanco J.E *et al.* 1996a; Blanco M. *et al.* 1997c). Las características de las cepas ECEP aisladas de conejos son diferentes a las implicadas en patología humana y pertenecen a un número limitado de serotipos, siendo el O109:H2 el detectado principalmente en cepas aisladas de gazapos, y O15:HNM, O20:H7, O103:H2, O128:H2, O132:H2, O153:H7 los principalmente identificados en cepas de conejos destetados (Peeters *et al.* 1984a,1984b; Blanco J.E. *et al.* 1996a; Penteadó *et al.* 2002). También son distintos los factores de adherencia de las cepas ECEP aisladas de conejos; se han descrito las fimbrias AF/R1 y AF/R2 (O'Hanley y Canteley, 1978; Milon *et al.* 1990).

1.3.2.4.1. Reservorio de ECEP

El reservorio principal de las cepas de ECEPt es fundamentalmente el ser humano, mientras que en raras ocasiones se aíslan de animales (Trabulsi *et al.* 2002; Hernandez *et al.* 2009). Por el contrario, las cepas de ECEPa están presentes tanto en humanos (Goffaux *et al.* 2000; Trabulsi *et al.* 2002; Beutin *et al.* 2003; Aktan *et al.* 2004) como en animales sanos o con diarrea. De hecho, la mayoría de las cepas de ECEP de origen animal carecen del gen *bfpA*, convirtiéndose los animales que las portan en reservorio de cepas ECEPa (Cid *et al.* 2001; Aktan *et al.* 2004; Blanco M. *et al.* 2005; Cortés *et al.* 2005; Krause *et al.* 2005; Malik *et al.* 2006; Aidar-Ugrinovich *et al.* 2007; Vu-Khac *et al.* 2007).

En la mayoría de los casos, estas cepas ECEPa han sido identificadas en el curso de estudios de caracterización de cepas de *E. coli* A/E aisladas de animales de producción, incluidos vacuno, ovino y caprino (Orden *et al.* 2002; Aktan *et al.* 2004; Blanco M. *et al.* 2005; Leomil *et al.* 2005; Cortés *et al.* 2005; Aidar-Ugrinovich *et al.* 2007; Otero *et al.* 2013). Además, las cepas ECEPa se han aislado de animales de compañía (perros y gatos) (Goffaux *et al.* 2000; Nakazato *et al.* 2004) y de otros animales, tanto domésticos como silvestres (caballos y ciervos, entre otros) (Beaudry *et al.* 1996; Carvalho *et al.* 2003; Blanco M. 2004a, Krause *et al.* 2005; Ishii *et al.* 2007).

Aunque no existe la evidencia certera de transmisión directa entre animales y el hombre, sí existen numerosos estudios que apoyan esta hipótesis, al demostrar que algunas cepas ECEPa de origen humano y animal no solo comparten serogrupos/serotipos (Aktan *et al.* 2004; Blanco M. *et al.* 2005; Leomil *et al.* 2005; Yuste *et al.* 2006; Horcajo *et al.* 2012), sino también marcadores de virulencia como los genes *ehxA* y *efa1/lifA* (Horcajo *et al.* 2012), y perfiles genéticos determinados por herramientas altamente discriminativas como PFGE (Moura *et al.* 2009; Horcajo *et al.* 2012).

1.3.2.5. *E. coli* verotoxigénicos (ECVT)

Con esta denominación (ECVT) se conocen todas aquellas cepas de *E. coli* capaces de producir alguno de los 2 tipos de citotoxina conocidas como verotoxinas (VT) o toxinas shiga (Stx). Los *E. coli* productores de verotoxinas han recibido diferentes nombres en la literatura científica: *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) y *E. coli* productores de Shiga-toxins (STEC) (Mora *et al.* 2011b).

Desde que fueron descubiertos por Konowalchuk y colaboradores en 1977, los *E. coli* verotoxigénicos se han convertido en una de las principales causas de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) en el hombre. Desde entonces se ha visto incrementada su incidencia hasta situarse actualmente entre los principales agentes infecciosos responsables de gastroenteritis (Slusker *et al.* 1997; Andreoli *et al.* 2002; Blanco J.E. *et al.* 2004; CDC, 2006).

Además de CH y SUH, los ECVT pueden provocar en seres humanos dolencias como diarrea no sanguinolenta, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) e incluso infecciones asintomáticas. La presentación clínica más común es la CH, caracterizada por un cuadro de grave dolor abdominal y diarrea sanguinolenta que cursa generalmente sin fiebre, a diferencia de la disentería. Aproximadamente el 10% de los pacientes con CH termina desarrollando SUH. Este síndrome afecta principalmente a niños y se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal agudo, que puede requerir diálisis e incluso trasplante. La tasa de mortalidad del SUH oscila entre un 5% y un 10% (Karmali, 1989; Blanco *et al.* 1993, 1995; Tarr *et al.* 2005; Karch *et al.* 2006).

La infección por ECVT fue confirmada por primera vez en EE.UU. en 1982 en dos brotes de CH que afectaron a 47 personas que habían comido en diversos restaurantes de comida rápida de la misma cadena (Riley *et al.* 1983). El ECVT causante de los brotes pertenecía al serotipo O157:H7, muy raramente aislado hasta el momento.

Desde su reconocimiento como patógeno, el número de brotes provocados por cepas de ECVT sorbitol negativo del serotipo O157:H7 aumentó de forma considerable en países desarrollados como EE.UU., Canadá, Japón y Reino Unido (Carter *et al.* 1987; Tarr *et al.* 1997; Rangel *et al.* 2005; Doorduyn *et al.* 2006).

A pesar de que las cepas ECVT causantes de infecciones y enfermedades en humanos pertenecen a un gran número de serotipos O:H, la mayor parte de los brotes y de casos esporádicos de CH se atribuyen a cepas del serotipo O157:H7. De hecho, este serotipo provocó el 65,7% de los casos confirmados de infecciones en humanos por ECVT en la UE entre los años 2007 y 2010 (EFSA/ECDC, 2012). Sin embargo, existen otros serogrupos considerados también altamente virulentos, ya que han sido reportados frecuentemente en infecciones humanas (O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145 y O157). Cabe destacar el O26:H11, considerado el segundo ECVT de mayor importancia por detrás del O157:H7, y que provocó en la UE el 18,6% de los casos de infección por este tipo de bacterias en el periodo 2007-2010 (EFSA/ECDC, 2012). Por todo esto, se suele clasificar a los ECVT en O157 y no O157.

En el año 2003 Karmali y colaboradores propusieron clasificar las cepas ECVT en cinco seropatotipos (del seropatotipo A al E), atendiendo a su incidencia y asociación con casos de SUH y brotes. En el año 2011 se añadió una categoría especial debido al brote provocado por el seropatotipo híbrido O104:H4 en Alemania (Mora *et al.* 2011b), ya que hasta la fecha ninguna cepa de ECVT había causado tantos casos de SUH (845 casos solo en Alemania) (AESAN, 2012). Finalmente, debido a su incidencia, se amplió el número de serotipos incluidos originalmente por Karmali (Tabla 12) (Brooks, 2005; EFSA, 2009, 2013; Bosilevac y Koohmaraie, 2011; USDA, 2011b; Delanoy *et al.* 2012; Bosilevac y Koohmaraie, 2012; Kobayashi, 2013).

Tabla 12. Clasificación de las cepas ECVT en seropatotipos y su relación con la virulencia (Karmali *et al.* 2003, Mora *et al.* 2011b)

ECVT	CARACTERÍSTICAS	SEROTIPOS
Categoría especial Cepas altamente virulentas asociadas con tasas elevadas de mortalidad.	Cepas enteroagregativas productoras de la toxina VT2a pertenecientes al serotipo O104:H4. Una cepa de esta categoría causó un gran brote de Alemania en el año 2011 que provocó numerosos casos de HUS, CH y muertes.	O104:H4
Seropatotipo A Cepas altamente virulentas	O157:H7 (no fermentadoras de sorbitol) y O157:H- (H=no móviles; fermentadoras de sorbitol) causantes de numerosos brotes y frecuentemente asociadas con casos esporádicos de HUS y HC. Las cepas poseen el gen <i>eae</i> .	O157:H7, O157H-
Seropatotipo B Cepas altamente virulentas	Incluye serotipos que han causado brotes ocasionales y son relativamente comunes en casos esporádicos de HUS y HC. Las cepas poseen el gen <i>eae</i> .	O26:H11/H-, O45:H2/H-, O103:H2, H11, H25/H-, O111:H8/H-, O121:H7, H19/H-, O145:H28/H-
Seropatotipo C Cepas con riesgo potencial elevado	El seropatotipo C incluye serotipos no responsables de brotes pero que se han aislado de casos esporádicos de HUS y HC. Se incluyen únicamente los serotipos considerados de mayor riesgo y prevalencia.	O1:H42, O5:H-, O7:H6, O76:H19, O80:H2, O86:H27, O91:H10/H21, O104:H21, O105:H18, O113:H21, O121:H2/H-, O123:H2, O128:H2, O165:H25, O174:H2/H21.
Seropatotipo D Cepas de riesgo moderado	El seropatotipo D incluye serotipos no responsables de brotes y que nunca se han asociado con HUS, pero que sí se han aislado de pacientes con patologías menos graves (diarrea sin síntomas severos). Se especifican únicamente los serotipos considerados de mayor riesgo y prevalencia.	O7:H4, O69:H11, O103:H25, O113:H4, O117:H7, O119:H25, O132:H-, O146:H21, O171:H2, O172:H, O174:H8
Seropatotipo E Cepas de bajo riesgo	Incluye una larga lista de serotipos aislados de animales, alimentos y del medioambiente no implicados nunca con casos clínicos/enfermedad en humanos.	Muchos serotipos

Los ECVT producen dos potentes citotoxinas que destruyen las células Vero denominadas verotoxinas (VT1 y VT2) o toxinas Shiga (Stx1 y Stx2). Existen varios subtipos de cada una de estas citotoxinas, VT1 (VT1a, VT1c y VT1d) y de la VT2 (VT2a, VT2b, VT2c, VT2d, VT2e, VT2f y VT2g). La capacidad de los ECVT para causar enfermedad en los seres humanos está claramente relacionada con el tipo y subtipo de toxinas. La VT2 es la toxina más potente, siendo los subtipos VT2a y, en menor medida, VT2d y VT2c los comúnmente asociados a SUH (Friedrich *et al.* 2002; Feng *et al.* 2011).

Las verotoxinas se encuentran codificadas en el genoma de profagos integrados en el cromosoma bacteriano (Muinesa *et al.* 2003; Allison, 2007), y están constituidas por una subunidad enzimática A de aproximadamente 33.000 d y 5 o 6 subunidades B que tienen un peso molecular de unos 7.500 d y fijan la toxina a receptores celulares compuestos por glucolípidos (Gb3 o Gb4). Estas toxinas inhiben la síntesis proteica al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 60S.

Si se produce suficiente cantidad de toxina en el intestino se produce un daño a nivel de

los vasos sanguíneos, lo que provoca que la diarrea acuosa evolucione hacia un cuadro de CH (Nataro y Kaper, 1998). Además, una vez liberadas las toxinas en el intestino, deben ser absorbidas por el epitelio intestinal para acceder a la circulación sanguínea, desde donde serán transportadas hacia las diferentes partes del cuerpo, siendo el riñón el órgano más afectado, provocando SUH (Andreoli *et al.* 2002) (Figura 9).

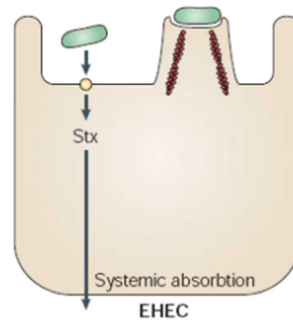


Figura 9. Mecanismo de patogenicidad de los ECVT (Kaper *et al.* 2004)

Además de las verotoxinas, los ECVT pueden portar otros factores de virulencia, como la isla de patogenicidad LEE que codifica un sistema de secreción tipo III; y proteínas efectoras que son homólogas a las producidas por ECEP, como las intiminas codificadas por el gen *eae* que les confiere la capacidad de producir la lesión A/E. La enterohemolisina o enterohemorrágica *E. coli* hemolysin (E-Hly o EHEC-hemolysin) (Jerse *et al.* 1990; Barret *et al.* 1992; Beutin *et al.* 1995; Oswald *et al.* 2000). El gen *saa*, que codifica para la adhesina autoaglutinante Saa, que fue descrita en cepas de ECVT que no poseen la isla de patogenicidad LEE y asociadas con SUH (Paton *et al.* 2001). La citotoxina subtilasa (SubAB), que incluye dos genes cotranscritos (*sub A* y *sub B*) implicados en la virulencia de las cepas ECVT (Paton *et al.* 2004). Experimentos in vivo han demostrado que la SubAB es letal para las células Vero (Paton *et al.* 2004), que puede participar directamente en el mecanismo de la diarrea en niños (Gerhardt *et al.* 2013) y que contribuye al SUH lesionando las células glomerulares endoteliales humanas (Amaral *et al.* 2013). Recientemente, se ha confirmado que debe ser considerado como marcador de virulencia, especialmente en cepas de ECVT responsables de infección alimentarias (Funk *et al.* 2013). Estos factores de virulencia (E-Hly, Saa y SubAB), se encuentran codificados en el plásmido pO113. Por último, otro factor de virulencia a tener en cuenta es el gen *stcE*, que juega un papel crítico en la colonización desenmascarando proteolíticamente la superficie de la célula del huésped para permitir la íntima adherencia de las ECVT a las células epiteliales del

intestino. El papel del *stcE* en la virulencia se atribuye a su metaloproteasa, que degrada y reduce la viscosidad de la capa mucosa intestinal, este gen se encuentra localizado en el plásmido pO157 (Grys *et al.* 2005).

1.3.2.5.1. Reservorio de ECVT

Está claramente demostrado que los rumiantes son el reservorio principal de los ECVT donde forman parte de la microbiota intestinal, comportándose como cepas comensales. Multitud de estudios han puesto de manifiesto que el ganado bovino, principalmente, siguiéndole en importancia el ovino y caprino, albergan en su microbiota intestinal cepas de ECVT, muchas de las cuales pertenecen a los mismos serotipos que las cepas causantes de infecciones en seres humanos (Armstrong *et al.* 1996; Bettelheim, 2000; Avery *et al.* 2004; Djordjevic *et al.* 2004; Padola *et al.* 2004; Blanco M. *et al.* 1993, 1994, 2003b, 2004b, 2004c, 2005; Blanco *et al.* 2001, 2003; Cortés *et al.* 2005; Hornitzky *et al.* 2005; Irino *et al.* 2005; la Regione *et al.* 2005; Liebana *et al.* 2005; Sheng *et al.* 2005; Timm *et al.* 2007). Incluso, estudios en Canadá y Francia demostraron que la incidencia de SUH en infecciones de ECVT en humanos está directamente relacionada con indicadores de densidad de ganado (Valcour *et al.* 2002; Haus-Cheymol *et al.* 2006).

En cuanto a la duración de la eliminación fecal del ECVT O157 y otros ECVT en el ganado bovino, varios estudios han señalado que ésta es variable, pudiendo durar desde algunas semanas hasta incluso años. Es necesario resaltar que la ecología de los ECVT en las granjas es aún bastante desconocida, así como las causas que provocan el aumento drástico de animales colonizados y la reducción posterior hasta la desaparición total de portadores en una determinada granja (Armstrong *et al.* 1996; Blanco *et al.* 2001; Hancock *et al.* 2001).

La prevalencia de los ECVT, en general, también es muy variable. Existen dos factores principales para esta variabilidad, primero la estacionalidad, ya que está demostrado que entre finales de verano y principios de otoño aparece un pico de prevalencia de ECVT en ganado (Elder *et al.* 2000); y en segundo lugar, la ubicación geográfica. Estudios realizados en Argentina (primer país en casos de SUH por habitante del mundo) han

demostrado que la prevalencia de ECVT en ganado vacuno varía entre el 22% y el 67% (Sanz *et al.* 1998; Parma *et al.* 2000; Chinen *et al.* 2003; Padola *et al.* 2004; Meichtri *et al.* 2004; Mercado *et al.* 2004). Por el contrario, los datos de la EFSA del año 2012, revelan que ese año se reportó en Europa una prevalencia de ECVT en ganado del 7,4% y del 1,8% para ECVT O157. En este caso, la prevalencia se hizo tomando los datos de 7 países (Austria, Dinamarca, Estonia, Finlandia, Alemania, Italia y Suecia). Sin embargo, si analizamos los países individualmente, vemos grandes diferencias entre ellos. Por ejemplo, para el mismo periodo (2012) Austria reportó una prevalencia del 32,1% de ECVT en ganado vacuno, mientras que Dinamarca, Estonia, Finlandia, Italia y Suecia, reportaron una baja prevalencia de ECVT y de ECVT O157 (del 1,7% al 8,4%) (EFSA/ECDC, 2014). En lo que respecta a España, en un estudio realizado en 2013, se detectó ECVT O157 en el 14,7% de las muestras analizadas (Ramoneda *et al.* 2013).

Los ECVT también se han aislado ocasionalmente de otros animales de producción (como cerdos y aves) y de animales silvestres, pero se considera que en muchos casos están presentes de forma transitoria, y que estos animales los han adquirido a través del alimento o agua contaminados por material fecal de rumiantes. En cualquier caso, estos hospedadores accidentales pueden ser vehículos de infección para los humanos (Sánchez *et al.* 2009, 2010; Mora *et al.* 2012).

El ganado porcino no está considerado como fuente de ECVT O157 ni de otras ECVT no O157 asociadas con infecciones en humanos. No obstante, en países europeos se han reportado tasas de prevalencia de ECVT O157 en heces de cerdos sacrificados que varían en un rango entre 0,2% y 2% (Heuvelink *et al.* 1998; Johnsen *et al.* 2001 y Bonardi *et al.* 2003) y en cerdos de cebo 0,4% (Schouten *et al.* 2005). Durante el periodo 2007-2010, 8 países miembros de la UE, reportaron datos sobre la detección de ECVT en cerdos, cuya prevalencia variaba entre el 0% y el 10,8%, y tan solo Alemania detectó ECVT O157, aunque a niveles muy bajos, variando entre el 0,1% y el 0,6% (EFSA/ECDC, 2012).

Fuera del continente europeo, la prevalencia de los ECVT O157 parece mantenerse también en niveles muy bajos: en Japón 1,4% (Nakazawa *et al.* 1999) y en EE.UU. 2% (Feder *et al.* 2003). La baja prevalencia observada en estos estudios podría ser resultado de la exposición accidental de las piaras de cerdos con ECVT O157 a través de la

contaminación de piensos o del medio ambiente con estiércol de rumiantes en granjas que no cumplen con las buenas prácticas de cría. Sin embargo, estudios realizados en Sudamérica muestran una tasa sorprendentemente elevada de ECVT O157 en heces de cerdos sacrificados (8-10%) (Borie *et al.* 1997; Ríos *et al.* 1999). Estas diferencias en las prevalencias pueden ser debidas a diferencias en los métodos de cría y prácticas de sacrificio (Caprioli *et al.* 2005).

Los ECVT también han sido aislados en aves. Existen varios estudios que han reportado el aislamiento de ECVT O157 y no O157 en gaviotas (Wallace *et al.* 1997 y Makino *et al.* 2000). A pesar de esto, no se considera a las gaviotas un verdadero reservorio de ECVT pero sí vectores potenciales de su diseminación (Caprioli *et al.* 2005). Las palomas sí parecen ser un reservorio natural para una variedad particular de ECVT, portadora en concreto del subtipo de verotoxina VT2f (Schmidt *et al.* 2000).

En lo que respecta a las aves de corral, en la mayoría de los estudios no se han detectado cepas de ECVT (Beutin *et al.* 1993; Heuvelink *et al.* 1999). Tampoco se detectó ninguna cepa ECVT en un estudio realizado entre Francia, Bélgica y España, en el que analizaron un total de 1.491 cepas de *E. coli* aisladas de pollos, pavos y patos (Schouler *et al.* 2012). En otros estudios sí se han detectado cepas ECVT con una prevalencia muy baja. En estudios realizados en Alemania y Hungría entre los años 2007 y 2010, solo Hungría detectó ECVT (3,9%), pero ninguna cepa ECVT O157 (EFSA, 2012). En Holanda, Schouten y colaboradores (2005) reportaron una prevalencia de ECVT O157 del 1,7% en pollos de engorde. Cepas de ECVT O157 se han aislado también de productos de aves de corral (Doyle y Schoeni, 1987; Leclercq y Mahillon, 2003) y del contenido intestinal de pavos (Heuvelink *et al.* 1999). También se han encontrado cepas de ECVT O157 en gallinas ponedoras (Schouten *et al.* 2005; Dipineto *et al.* 2006).

En cuanto al papel de la fauna silvestre como reservorio de cepas de ECVT, destacar que en un estudio realizado en Galicia en el que se analizaron muestras fecales de 179 corzos, 262 jabalíes y 260 zorros, se aislaron cepas ECVT no O157 en el 52,5%, 8,4% y 1,9% de las mismas respectivamente, y solo se aislaron cepas ECVT O157 en el 0,56% de los corzos y 0,38% de los jabalíes. Globalmente, el 40% de los animales silvestres muestreados portaban cepas ECVT que compartían un perfil similar a las aisladas de

pacientes humanos en cuanto a la combinación de serotipo, filogrupo, perfil de virulencia, tipo de intimina y subtipo de verotoxina. Además, las cepas aisladas de animales silvestres de los serotipos O5:HNM-A, O26:[H11]-B1, O76:H19-B1, O145:[H28]-D, O146:H21-B1 y O157:H7-D mostraron perfiles de PFGE con una similitud superior al 85% con cepas de ECVT humanas, confirmando que, aunque no sean reservorio principal, la fauna silvestre es portadora de cepas potencialmente patógenas para el hombre y parece jugar un papel importante en el mantenimiento de los ECVT (Mora *et al.* 2012).

1.3.2.5.2. Resistencia de los ECVT a los antibióticos

Uno de los temas más controvertidos en el manejo de una infección por ECVT, radica en el posible efecto de los antibióticos en el transcurso de la misma. De manera general, los antibióticos no están recomendados como tratamiento ante infecciones por ECVT O157, ya que es posible que éstos rompan la pared celular de las bacterias, liberando de esta manera las verotoxinas (Walterspiel *et al.* 1992, Wong *et al.* 2000), y/o incrementando la expresión de los genes de las verotoxinas *in vivo* (Zhang *et al.* 2000). Sin embargo, algunos estudios sugieren que algunos antibióticos, si se administran en fases tempranas de la infección, pueden prevenir que ésta desemboque en SUH (Fukushima *et al.* 1999; Ikeda *et al.* 1999). Incluso, Menne y colaboradores (2012) concluyeron que durante el brote por ECVT-ECEA O104:H4 en 2011, el uso de un tratamiento agresivo de antibióticos para los casos de SUH mejoró la condición de los pacientes.

A pesar de que la terapia antimicrobiana no es la herramienta primaria para el tratamiento de las infecciones por ECVT, y que inicialmente los estudios indicaban que las cepas ECVT O157 eran sensibles a muchos antibióticos (Griffin y Tauxe, 1991; Izumikawa *et al.* 1998; Schmidt *et al.* 1998), investigaciones posteriores han ido documentando la detección de resistencia a antibióticos en cepas ECVT O157 y especialmente entre las no O157 (Schmidt *et al.* 1998; Galland *et al.* 2001; Stephan y Schumacher, 2001; Khan *et al.* 2002; Mora *et al.* 2005).

En España, Mora y colaboradores (2005) realizaron un estudio de resistencias frente a 26 antimicrobianos frecuentemente utilizados en medicina humana y veterinaria en una

colección de 722 cepas ECVT aisladas entre los años 1992-1999 de pacientes humanos (en su mayoría con cuadros diarregénicos), ganado vacuno y ovino sanos, y carne picada de vacuno. Como resultado encontraron un nivel de resistencia similar (41%) entre las cepas ECVT O157 (58/141) y las no O157 (240/581) frente a al menos 1 de los antimicrobianos analizados. Globalmente, los porcentajes de resistencias más elevados fueron frente al sulfisoxazole (36%), tetraciclina (32%), ampicilina (10%), trimetoprim (8%), cotrimoxazole (8%), cloranfenicol (7%), kanamicina (7%), piperacilina (6%) y neomicina (5%). El 7% de las cepas ECVT O157 y el 12% de las no O157 mostraron multiresistencia a 5 o más antimicrobianos, y el perfil de resistencia múltiple más común fue estreptomicina-sulfisoxazole-tetraciclina. La mayoría de las cepas multiresistentes a 5 o más antimicrobianos pertenecían a los serotipos O4:H4, O8:H21, O20:H19, O26:H11, O111:HNM, O118:HNM, O118:H16, O128:HNM, O145:H8, O145:HNM, O157:H7, O171:H25, O177:H11, ONT:HNM y ONT:H21. En este estudio se encontró, además, un mayor nivel de resistencias a numerosos antibióticos (ampicilina, amoxicilina+ácido clavulánico, piperacilina, estreptomicina, kanamicina, neomicina, tetraciclina, cloranfenicol y sulfisoxazole) entre cepas ECVT no O157 portadoras del gen *eae* frente a cepas *eae* negativas. Asimismo, se encontró una asociación positiva entre cepas ECVT no O157 positivas para el gen *vt1* y un mayor nivel de resistencias frente a ampicilina, amoxicilina+ácido clavulánico, piperacilina, cefalotina, estreptomicina, kanamicina, neomicina, cloranfenicol, trimetoprim y cotrimoxazole.

En general, los datos obtenidos en el estudio plantearon importantes interrogantes en cuanto al potencial impacto del uso antibiótico en animales y sobre la posible entrada de patógenos resistentes en la cadena alimentaria. Debido a que los principales antibióticos implicados en las resistencias detectados eran, presumiblemente, de uso veterinario, y que el ganado vacuno constituye un importante reservorio de ECVT patógenos para humanos, se podía asumir que los fenotipos resistentes tenían como origen el ganado, sin embargo, no se pudo determinar de manera concluyente que las altas tasas de resistencia observadas en dicho estudio fueran consecuencia del uso de esos antimicrobianos en animales de producción (Mora *et al.* 2005). No obstante, son muchos los estudios que apoyan la hipótesis de que cepas de ECVT resistentes se transfieren de animales a humanos a través de los alimentos y que son provocadas por el

uso indebido de antimicrobianos en medicina veterinaria (Schroeder *et al.* 2002a, 2002b; Rajkhowa y Sarma, 2014).

Estudios más recientes demuestran que las cepas ECVT han adquirido un nivel de resistencias alarmante. Cergole-Novella y colaboradores (2011) estudiaron los patrones de resistencia a 12 antimicrobianos y las características moleculares de 32 cepas ECVT no O157 aisladas en Sao Paulo (21 de infecciones humanas y 11 de ganado vacuno). Los mayores niveles de resistencia fueron frente a la tetraciclina (100%), estreptomycinina (78%) y cotrimoxazole (56%). Además 11 cepas ECVT resistentes a la ampicilina eran portadoras del gen *bla*_{TEM} y fueron confirmadas como TEM-1. La identificación de este tipo de β -lactamasa en una cepa ECVT había sido descrita por primera vez en un brote familiar por ECVT O157 ocurrido en 2003 en Hiroshima (Ahmed *et al.* 2005), en el que 1 de las 4 cepas aisladas presentaba multirresistencia a estreptomycinina, espectinomycinina, cotrimoxazole, ampicilina y tetraciclina y además era portadora de un gen codificador de la β -lactamasa del tipo TEM-1.

Hasta el momento son pocos los estudios que han informado de la presencia de cepas ECVT productoras de BLEE. Se han descrito cepas ECVT aisladas de humanos pertenecientes a un limitado número de serotipos/serogrupos O26:HNM, O26:H11, O64, O157:H7 productoras de las β -lactamasas TEM-52, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-18 o CTX-M-1 (Ishii *et al.* 2005; Buvens *et al.* 2010; Dutta *et al.* 2013; Torpdahl *et al.* 2013; Ewers *et al.* 2014), además de la cepa ECVT-ECEA O104:H4 CTX-M-15 implicada en el brote alemán de 2011 (Frank *et al.* 2011); pero no cabe duda de que el escenario está cambiando. Ishii y colaboradores (2005) describieron por primera vez este tipo de enzimas en una cepa O26:H11 VT1 aislada de una muestra de diarrea de una niña de 9 años en Japón, en junio de 2004 y que, por secuenciación, fue tipificada como CTX-M-18. Torpdahl y colaboradores (2013) reportaron el primer caso de ECVT O157 BLEE aislado de un caso de diarrea sanguinolenta de una niña de 2 años que había visitado una granja. La cepa resultó ser portadora de los genes *bla*_{TEM-104} y *bla*_{CTX-M-28}.

En el caso de cepas ECVT productoras de BLEE de origen animal, todavía son más escasas las referencias y solo se ha descrito hasta el momento 1 cepa O157 CTX-M-2 aislada de una gallina, 1 cepa O111:H8 CTX-M-15 aislada de vacuno y 2 cepas CTX-M-1

O145:HNM y ONT:HNM, respectivamente, aisladas de terneros con diarrea (Roest *et al.* 2007; Valat *et al.* 2012; Ewers *et al.* 2014).

En cuanto a las cepas ECVT aisladas de alimentos, pocos estudios han analizado en profundidad los perfiles moleculares de resistencia de cepas con este origen. Recientemente, Ahmed y Shimamoto (2015) analizaron las bases genéticas de la multirresistencia de 54 cepas ECVT O157 aisladas de 1.600 muestras de alimentos (800 productos cárnicos de ave y vacuno y 800 de productos lácteos), obtenidos en 2010 en puntos de venta de diferentes ciudades y pueblos de Egipto. Encontraron que el 57,4% (31/54) de las cepas eran multirresistentes a al menos 3 clases de antimicrobianos. El mayor nivel de resistencia detectado fue a la kanamicina (96,8%), seguido de la espectinomicina (93,6%), ampicilina (90,3%), estreptomycinina (87,1%) y tetraciclina (80,6%). Se detectaron genes codificadores de β -lactamasas en el 63% de las cepas ECVT: *bla*_{TEM-1} (35,2%), *bla*_{TEM-52} (1,9%), *bla*_{CMY-2} (13%), *bla*_{CTX-M} (5,6%), *bla*_{SHV-12} (5,6%) y *bla*_{oxa-1} (1,9%). En este estudio, además, se describe por primera vez la identificación de genes plasmídicos de resistencia a las quinolonas en ECVT O157, detectados en el 13% (7/54) de las cepas analizadas.

1.3.3. Grupos filogenéticos de *E. coli*

Como ha quedado evidenciado en los apartados anteriores, *E. coli* es una de las especies bacterianas más versátiles que existen. Alterna entre su hábitat primario, el intestino de los vertebrados, donde vive como comensal (Tenailon *et al.* 2010), y el secundario, agua y sedimentos (Savageaus, 1983). También puede actuar como patógeno extra e intrainestinal en humanos y muchas otras especies animales (Kaper *et al.* 2004). Esta diversidad de hábitats es debida a la gran plasticidad de su genoma, que presenta pérdida y ganancia de genes a través de transferencia horizontal (Rasko *et al.* 2008; Touchon *et al.* 2009). Esta especie posee un *core genome* de menos de 2.000 genes, sin embargo, en su repertorio genético se encuentran más de 10.000 genes (Rasco *et al.* 2008; Touchon *et al.* 2009). Así, los diversos fenotipos observados son el resultado, principalmente, de un gran número de combinaciones genéticas diferentes.

A pesar del gran grado de flujo genético y la enorme diversidad genética, la estructura de

la población de esta especie parece casi clonal debido a la existencia de clones ampliamente diseminados y prevalentes entre las cepas patógenas (Touchon *et al.* 2009), con la clara definición de, por lo menos, 6 grupos filogenéticos principales (A, B1, B2, D, E y F) (Jauregui *et al.* 2008). Se ha demostrado que los antecedentes genéticos juegan un papel en la adquisición, retención y expresión de ADN foráneo (Escobar-Paramo *et al.* 2004).

Diferentes estudios señalan que los patotipos de *E. coli* se distribuyen en grupos filogenéticos concretos. Así, el grupo de los ExPEC incluye cepas pertenecientes a los filogrupos B2 y D; los diarreagénicos normalmente muestran los filogrupos A, B1 y D; y las cepas de *E. coli* comensales no patógenas pertenecen a los filogrupos A y B (Martínez-Medina *et al.* 2009; Okeke *et al.* 2010; Blanco *et al.* 2011; Chattaway *et al.* 2011; Mora *et al.* 2012).

1.4. ECVT en alimentos

De todos los grupos de *E. coli* patógenos cabe destacar, por su gran importancia en las infecciones de origen alimentario y por ser considerados como patógenos emergentes causantes de patologías muy graves en seres humanos, el grupo de los *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) y muy especialmente los enterohemorrágicos altamente virulentos del serotipo O157:H7 (ECVT O157) (Blanco *et al.* 2003, AESAN-2012-007).

Aunque la mayoría de los brotes se han asociado al consumo de carne o de alimentos cárnicos de origen bovino mal cocinados (CDC, 2007b, 2008, 2009a, 2009c, 2010a, 2011a, 2014a), también aparecen implicados otros alimentos como: alimentos precocinados y congelados (CDC, 2007a, 2009b, 2013c), lechugas (Söderström *et al.* 2005; CDC, 2010b, 2010d, 2012a), quesos (CDC, 2010c), frutos secos (CDC, 2011b), brotes (CDC, 2011c, 2012c, 2014b), espinacas (CDC, 2006, 2012b), ensaladas listas para el consumo (Bolduc *et al.* 2004; CDC, 2013b), sidra no pasteurizada (Vojdani *et al.* 2008), carne de cerdo asada (Trotz-Williams, 2012), e incluso mariscos (la AECOSAN ha reportado en los últimos años, varias notificaciones por ECVT en mariscos, sobre todo en bivalvos). La fuente más probable de contaminación cruzada para estos alimentos es el contacto con carne o heces (rumiantes o humanas) portadoras de ECVT.

1.4.1. Ciclo de transmisión de ECVT

Como hemos indicado en apartados anteriores, está claramente demostrado que los rumiantes son el reservorio principal de los ECVT, fundamentalmente el ganado bovino, siguiéndole en importancia el ovino y caprino. La materia fecal de rumiantes está, por tanto, claramente reconocida como la fuente de origen de un gran porcentaje de infecciones humanas por ECVT, siendo el origen del ciclo de transmisión de los ECVT. Ésta puede contaminar la carne durante el sacrificio en matadero, llegando a las superficies de las canales cepas de *E. coli* procedentes de la microbiota intestinal del animal, lo mismo ocurre durante el ordeño, contaminándose casi siempre la leche con bacterias intestinales. Además, es muy importante tener en cuenta que en el medio ambiente, tanto en el agua como en el suelo, las heces bovinas pueden permanecer infectivas durante varios meses, y el hecho de que éstas sean arrastradas por corrientes de agua, tiene importantes implicaciones para su diseminación en cultivos mediante la aplicación directa de estiércol, por riego con agua contaminada o directamente al hombre por contacto con agua o tierra contaminada (Maule, 1999) (Figura 10).

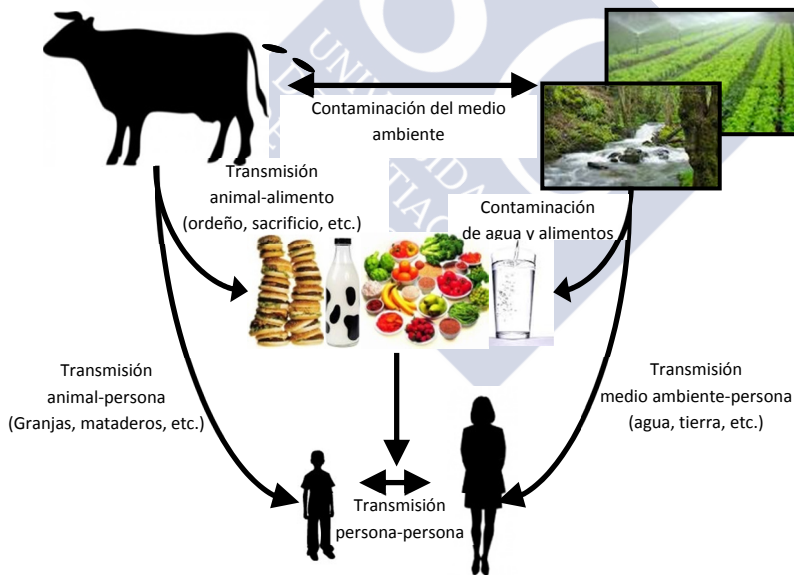


Figura 10. Ciclo de transmisión de los ECVT

Por otro lado, algunos animales como insectos, aves, roedores y otros silvestres pueden transportar esas bacterias desde las heces al agua de bebida y los alimentos. Los seres humanos, por tanto, pueden infectarse a través del contacto directo con una persona infectada o un animal portador, o indirectamente a través del medio ambiente,

alimentos, agua de bebida o agua superficial que contenga material fecal contaminada con ECVT de origen humano o animal (Mora *et al.* 2011b; AESAN-2012-007).

1.4.2. Epidemiología de los ECVT

Como se ha comentado en el apartado anterior, la transmisión de ECVT al hombre se produce, bien a través del consumo de alimentos o agua contaminados (fuente principal de infección), o bien por la exposición a ambientes contaminados, ya sea por contacto directo o indirecto con las heces de animales portadores (Armstrong *et al.* 1996; Ferens y Hovde, 2011). Se estima que la dosis infectiva para el ser humano es <100 bacterias (Tuttle *et al.* 1999), por lo que esta baja dosis para ECVT implica que la diseminación persona-persona es común, una vez producida la infección primaria (Parry y Salmon, 1998; Locking *et al.* 2011).

Los ECVT están implicados tanto en infecciones esporádicas como en infecciones epidémicas. Mientras que los pequeños brotes debidos a la diseminación persona-persona ocurren fundamentalmente en centros del tipo escuelas infantiles (Rangel *et al.* 2005; Wahl *et al.* 2011), los grandes brotes están asociados en la mayoría de los casos con la transmisión por alimentos (Michino *et al.* 1999; Buchholz *et al.* 2011; Herman *et al.* 2015) y el contacto con rumiantes, como es el caso de granjas abiertas al público (Willshaw *et al.* 2003; Ihekweazu *et al.* 2012).

La mayoría de las infecciones notificadas por ECVT afectan a niños (Willshaw *et al.* 2001; Carroll *et al.* 2005; Vally *et al.* 2012; Byrne *et al.* 2015). Si bien es cierto que los resultados suelen estar sesgados, puesto que acuden antes a un centro primario los niños con procesos intestinales que los adultos, y tienen más probabilidades de una toma de muestra para aislamiento. En todo caso, existen factores que hacen más susceptibles a los niños a la infección, como es la facilidad de transmisión persona-persona en las escuelas infantiles por el estrecho contacto entre ellos (Rangel *et al.* 2005; Wahl *et al.* 2011); también la exposición ambiental al patógeno es un factor de riesgo en los niños así como los factores relacionados con la higiene y la mayor sensibilidad inmunológica. El mayor número de casos afecta especialmente al rango de 1-4 años (Byrne *et al.* 2015; Sodha *et al.* 2015).

Algunos estudios describen diferencias de prevalencia en adultos ligadas al sexo, con valores superiores en las mujeres (Schimmer *et al.* 2008; Frank *et al.* 2011; Vally *et al.* 2012; Vrbova *et al.* 2012). Las hipótesis para esta correlación no están bien establecidas, sugiriéndose desde factores ligados al hospedador femenino que favoreciesen el desarrollo de síntomas más graves, hasta a factores derivados de hábitos o actividad laboral (mayor exposición al patógeno alimentario por manipulación de los alimentos y hábitos de consumo, mayor exposición al patógeno transmitidos persona-persona por actividad en centros infantiles o cuidado de niños, etc.).

La distribución geográfica de las infecciones por ECVT en distintos países es muy heterogénea. Destaca el hecho de que dentro de la latitud norte, las regiones más septentrionales presentan una mayor incidencia de casos. Este fenómeno se ha observado tanto en EE.UU. (Sodha *et al.* 2015) y Canadá (Waters *et al.* 1994), como en el continente europeo, donde la incidencia es mayor en países como Alemania y Dinamarca en relación con los datos de España e Italia (Caprioli y Tozzi, 1998). Incluso el Reino Unido e Irlanda presentan esta diferencia, de manera que Irlanda y Escocia reportan niveles de infección superiores al doble de los de Inglaterra (Carroll *et al.* 2005; Locking *et al.* 2011; EFSA/ECDC, 2012). Por el contrario, en el hemisferio sur, los mayores índices de infección ocurren en los países más meridionales. Así, en Argentina, el país con la mayor densidad de ganado vacuno y la mayor incidencia a nivel mundial de casos de SUH, son las provincias del sur y centrales las más afectadas (Rivas *et al.* 2008; Rivero *et al.* 2012). Lo mismo ocurre con el continente africano (Effler *et al.* 2001). Globalmente, los datos indican un mayor número de casos de infección por ECVT asociados a entornos rurales, con una incidencia de hasta 4 veces superior para las personas de hábitat rural con respecto a poblaciones urbanas (Byrne *et al.* 2015). Este hecho estaría relacionado con la actividad de cría de rumiantes y, por tanto, con el contacto con la ganadería (Carroll *et al.* 2005; Strachan *et al.* 2006).

Los estudios llevados a cabo en distintos países (Alemania, Austria, EE.UU., Canadá, Escocia, Australia, Argentina) demuestran la estacionalidad de las infecciones por ECVT O157 y de la incidencia de SUH, con un repunte de casos en los meses más cálidos (Waters *et al.* 1994; Slutsker *et al.* 1997; Besser *et al.* 1999; Gerber *et al.* 2002; Tarr *et al.*

2005; Rivero *et al.* 2012; Sodha *et al.* 2015). Las infecciones por ECVT no O157 y los brotes también muestran un patrón de estacionalidad (Ostroff *et al.* 1989; Gillespie *et al.* 2003; Buvens *et al.* 2012; Devaux *et al.* 2015).

Uno de los factores relacionados con la estacionalidad de los casos en seres humanos sería el hecho de que el ganado vacuno, principal reservorio de los ECVT, presenta también un patrón de eliminación de esta bacteria en heces que se incrementa en verano y primera parte del otoño, tanto en el caso de ECVT O157 (Hanckock *et al.* 1997) como no O157 (Menrath *et al.* 2010).

El ECVT O157 sigue siendo el serogrupo más identificado en pacientes humanos en algunos países, tanto en casos esporádicos como en brotes (Thomas *et al.* 1996; Willshaw *et al.* 2001; Byrne *et al.* 2015). Sin embargo, los países que hacen un seguimiento rutinario de otros serotipos, indican que su implicación en patología humana es superior a la detectada en estudios previos (Blanco *et al.* 2003; Carroll *et al.* 2005; Schimmer *et al.* 2008; Frank *et al.* 2011; EFSA, 2012).

Las infecciones con algunas cepas de ECVT no O157 también están asociadas con casos clínicos graves en humanos. La diarrea severa, especialmente la CH y el SUH están estrechamente relacionados con tipos de ECVT portadores del gen *eae* de la intimina. Por el contrario, otros serotipos de ECVT no O157, negativos para el gen *eae*, raramente se han visto implicados en brotes graves y se han encontrado con más frecuencia en portadores asintomáticos o en casos leves de diarrea. Sin embargo, la producción de la intimina no es esencial para la patogénesis, ya que un número de casos esporádicos de SUH ha sido causado por ECVT no O157 *eae* negativo (Feng *et al.* 2001; Mora *et al.* 2011b).

Según datos del USDA, entre los años 2003 y 2006 se reportaron en EE.UU. un total de 1.252 cepas no O157 aisladas de pacientes con infección por ECVT, cuyos serotipos más frecuentemente aislados coinciden con los relacionados con brotes (Tabla 13). Además, cabe destacar, que el 83,4% de los casos pertenecían a un grupo de 6 serotipos (O26, O103, O111, O45, O121 y O145), mientras que el 16,6% restante estaba formado por 53 serogrupos diferentes (USDA, 2011b).

Tabla 13. Serotipos no O157 aislados de pacientes en EE.UU. (2003-2006) (USDA, 2011b)

Serogrupo	N° de cepas reportadas	
O26	309	26,80%
O103	224	19,40%
O111	188	16,30%
O45	99	8,60%
O121	81	7,00%
O145	61	5,30%
Otros	190	16,60%

En cuanto a Europa, informes de EFSA del periodo 2009-2012, indican que los serogrupos aislados con mayor frecuencia en pacientes son, por orden de prevalencia: O157, O26, O103, O91 y O145 (Tabla 14) (EFSA/ECDC, 2011a, 2012, 2013, 2014).

Tabla 14. Casos de infección por ECVT confirmados en países miembros de la UE y reportados a EFSA (2009-2012) (EFSA/ECDC, 2011a, 2012, 2013, 2014)

Serogrupo	N° de casos	%total
O157	7009	43%
O26	994	6%
O103	404	3%
O91	278	2%
O145	245	2%
O111	159	1%
O128	138	1%
O146	135	1%
O63	84	1%
O113	22	1%
ONT	4263	26%
Otros	3655	8%

En el caso de España, los serotipos más frecuentemente detectados en coprocultivos de pacientes del HULA, coinciden con los más habituales a nivel europeo (Tabla 15) (Mora *et al.* 2011b, LREC datos sin publicar).

Tabla 15. Serotipos de ECVT más frecuentemente detectados en cepas humanas aisladas en Lugo (2003-2013) (Mora *et al.* 2011b; LREC, datos sin publicar)

Serotipo	Grupo Filogenético	Seropatotipo	Intimina
O5:H-	A	C	β 1
O26:H11	B1	B	β 1
O103:H2	B1	B	ϵ 1
O111:H8	B1	B	θ
O113:H21	B1	C	-
O118:H16	B1	C	β 1
O145:H-	D	B	γ 1
O146:H21	B1	D	-
O157:H7	D	A	γ 1

El CDC estima que aproximadamente un tercio de las infecciones provocadas por ECVT en EE.UU., son consecuencia de serotipos no O157 (Kaspar *et al.* 2010). Algunos estudios apuntan a que los ECVT no O157 puede causar diarrea en ese país con la misma

frecuencia que los ECVT O157, pero que sin embargo, su identificación es menos frecuente en casos de patologías severas, como el SUH.

El CDC publicó en 2013 los datos de incidencia de Infecciones por ECVT confirmadas y reportadas en los EE.UU. durante el periodo 1996-2011, donde se aprecia un aumento significativo del número de infecciones por ECVT no O157 desde el año 2004 (CDC, 2013a). De la misma manera, datos extraídos de los sumarios de enfermedades infecciosas de declaración obligatoria de ese país, muestran un aumento del porcentaje de casos de infecciones asociadas con ECVT no O157, pasando éste de un 5% en 2002 a un 16% en 2005. Sin embargo, y aunque se aprecia un aumento significativo de los casos de infecciones por ECVT no O157 en ambos informes, existen indicios de que, en general, este aumento puede deberse a la introducción de nuevos métodos para la detección de diferentes serotipos de ECVT. Un estudio de vigilancia realizado en EE.UU en un área catalogada como de baja incidencia en ECVT, en el que se aplicaron nuevas técnicas en cuanto a la detección de ECVT no O157, reportó un aumento del número de casos de <1 a 11 casos/año/100.000 población, y un 56% de las cepas aisladas fueron no O157 (Lockary *et al.* 2007). Además, Gould (2009), realizó un estudio en el que también apoya esta teoría, determinando que en EE.UU. el aumento en la detección de ECVT no O157 está directamente relacionado con la introducción en laboratorios de técnicas moleculares para la detección de ECVT no O157 (Figura 11).

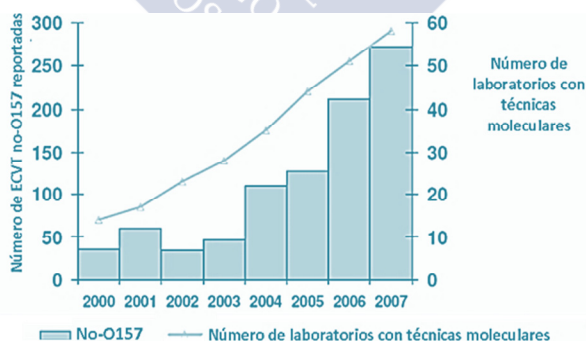


Figura 11. Evolución de la prevalencia de ECVT no O157 vs. Introducción en laboratorios de técnicas moleculares (2000-2007) (Gould, 2009)

En lo que respecta a la virulencia, las patologías causadas por ECVT no O157 tienden a ser menos severas que aquellas causadas por ECVT O157 (Gould, 2009). EL CDC estima que tan solo el 12,8% de los pacientes infectados por no O157 requieren hospitalización frente al 46,2% de los pacientes infectados por O157. De igual manera, el índice de

pacientes que desarrolla SUH por ECVT no O157 es, según el CDC, del 1,7% frente al 6,3% del ECVT O157, y la tasa de mortalidad para los ECVT no O157 se encuentra en el 0,3% frente al 0,5% provocada por el ECVT O157 (Scallan *et al.* 2011).

1.4.2.1. Brotes por ECVT O157 y no O157

En la Tabla 16 se reflejan 34 grandes brotes (>100 casos) descritos, provocados por ECVT a nivel mundial (Doyle *et al.* 2006; Kaspar *et al.* 2010; Blanco, 2012; Catford *et al.* 2014).

Tabla 16. Brotes provocados por ECVT a nivel mundial (≥100casos). En azul los brotes provocados por ECVT no O157, en rojo los brotes de origen no alimentario. (Doyle *et al.* 2006; Kaspar *et al.* 2010; Blanco, 2012; Catford *et al.* 2014)

Año	Nº de casos	SUH	Muertes	Vía de transmisión	País	Cepa	Referencia
1996	12.680	121	12	Brotes de Rábano	Japón	O157:H7	Michino <i>et al.</i> 1999; Fukushima <i>et al.</i> 1999; Yamasaki <i>et al.</i> 1997
2011	3.816	845	54	Semillas/brotes de fenogreco	Alemania Francia	O104:H4	Blanco, 2012
2000	2.300	27	7	Agua de bebida	Canada	O157:H7	Hrudey <i>et al.</i> 2003
2012	1.642	-	-	Rábano, (kimchi)	Corea	O169	Hu <i>et al.</i> 2013
1999	>1.000	11	2	Agua de pozo	EE.UU.	O157:H7	Charatan, 1999
2000	788	4	1	Carne de vacuno, contaminación cruzada con otros alimentos (Sizzler)	EE.UU.	O157:H7	Archer, personal communication
1992-1993	>700	37	3	Hamburguer (Jack in the Box)	EE.UU.	O157:H7	Bell <i>et al.</i> 1994; Brandt <i>et al.</i> 1994; Davis, 1994; Tuttle <i>et al.</i> 1999
1995	633	2	0	Agua de grifo	Escocia	O157:H7	Jones <i>et al.</i> 1996
1991	521	22	2	Carne picada	Canada	O157:H7	Orr <i>et al.</i> 1994
1996-1997	512	-	17	Carne	Escocia	O157:H7	Cowden <i>et al.</i> 2001
1996	503	34	20	Carne	Escocia	O157:H7	Pennington, 1998
2008	341	25	1	Comida de restaurante	EE.UU.	O111:HNM	Oklahoma State Dept of Health, 2009
1997	332	1	0	Comida de restaurante	Reino Unido	O157:H7	Anónimo, 1997
1999	329	-	-	Carne de vacuno	EE.UU.	O157:H7	Depto. de Salud de Illinois, 1999
1990	243	2	4	Agua de pozo	EE.UU.	O157:H7	Swerdlow <i>et al.</i> 1992
1991	234	-	-	Desconocido	Japón	O111:H-	Banatvala <i>et al.</i> 1996
2004	213	-	-	Sidra no pasteurizada	EE.UU.	O111	Vojdani <i>et al.</i> 2008
2000	>200	6	0	Salchichas (Catering de un colegio)	España	O157:H7	Muniesa <i>et al.</i> 2003
2011	181	-	0	Carne cruda	Japón	O111	National Institute of Infectious Diseases, Japan
1999	159	-	-	Animales-Zoo	Canada	O157:H7	Warshawsky <i>et al.</i> 2002
2005	157	2	1	Carne	Reino Unido	O157:H7	Salmon, 2005
1998	157	4	-	Agua de grifo	EE.UU.	O157:H7	Olsen <i>et al.</i> 2002
1999	143	6	0	Salami	Canada	O157:H7	MacDonald <i>et al.</i> 2004
2007	135	-	0	Queso pasteurizado	EE.UU.	O26	CDC, 2013a
1996	131	0	0	Ensaladas	Japón	O118:H2	Hashimoto <i>et al.</i> 1999
1999	127	14	2	Agua de pozo	EE.UU.	O157:H7	Novello, 1999; New York State, Dept of Health, 2000
2005	120	7	0	Lechuga	Suecia	O157:H7	Söderström <i>et al.</i> 2005
1999	114	3	-	Leche pasteurizada	Reino Unido	O157:H7	Goh <i>et al.</i> 2002
1995-1996	110	29	0	Desconocido	Suecia	O157:H7	Ziese <i>et al.</i> 1996
2002	109	0	2	Ensaladas	Canada	O157:H7	Bolduc <i>et al.</i> 2004
1997	108	4	0	Brotes de alfalfa	EE.UU.	O157:H7	Como-Sabetti <i>et al.</i> 1997
2004	108	15	-	Animales-Zoo	EE.UU.	O157:H7	Davies <i>et al.</i> 2005
2004	107	0	0	Carne	Japón	O111:HNM	Kato <i>et al.</i> 2005
2000	102	-	-	Agua de bebida	EE.UU.	O111	Lee <i>et al.</i> 2002
2000	102	-	-	Agua de riego	EE.UU.	O157:H7	Lee <i>et al.</i> 2002
1994	>100	9	1	Leche pasteurizada	Escocia	O157:H7	Upton <i>et al.</i> 1994
1984	100	-	0	Desconocido	Japón	O145:H-	Johnson <i>et al.</i> 1996

En la Tabla 17 se puede observar el número de brotes con menos de 100 casos descritos a nivel mundial en el periodo 1986-2006, provocados por ECVT pertenecientes a distintos serogrupos (Doyle *et al.* 2006).

Tabla 17. Serogrupos asociados a brotes con < 100 casos a nivel mundial (1986-2006) (Doyle *et al.* 2006)

Serogrupo	Nº de brotes (<100 casos)	
O157	179	70,8%
O26	32	12,6%
O111	20	7,9%
O103	5	2,0%
O121	4	1,6%
O145	3	1,2%
O80	2	0,8%
O45	1	0,4%
O51	1	0,4%
O55	1	0,4%
O86	1	0,4%
O104	1	0,4%
O115	1	0,4%
O119	1	0,4%
O148	1	0,4%

En España, los ECVT han provocado, al menos, 17 brotes: 14 han sido por ECVT O157, y 3 por ECVT no O157, concretamente por los serogrupos O26 y O111 (Tabla 18). En el estudio de Byrne y colaboradores (2015), se analizaron 3.717 casos de infección por ECVT ocurridos entre 2009 y 2012, de los cuales 91 estaban asociados a turistas que habían visitado España, siendo el tercer país más frecuentemente visitado entre los casos asociados a viajes (Byrne *et al.* 2015).

Tabla 18. Brotes causados por ECVT en España

Lugar-Referencia	Año	Afectados Situación	Serotipos Verotoxinas Fagotipos	Nº Afectados
Ibiza Smith <i>et al.</i> 1987	1986	Turistas británicos en un hotel	O157:H7 VT2	3(+3asintomáticos)
Islas Baleares Willshaw <i>et al.</i> 1996	1994	Turistas británicos	O157:H7 VT2 Fagotipo 2	Sin especificar
Álava Blanco J.E. <i>et al.</i> 1996c	1995	Chicos en una casa de campo	O111:H- VT1	13
Madrid Soler Crespo <i>et al.</i> 2000	1996	Familiar	O157:H7	3
Las Palmas Soler Crespo <i>et al.</i> 2000	1997	Turistas en urbanización	O157:H7	11 (3 con SUH)
Fuerteventura Pebody, 1999	1997	Turistas europeos en cuatro hoteles	O157:H7 VT2 Fagotipo 2	14 (3 con SUH)
Guipúzcoa Gomariz <i>et al.</i> 2000	1999	Niños de una guardería	O157:H7	8 (1 con SUH) (+6 asintomáticos)
Guipúzcoa Gomariz <i>et al.</i> 2000	1999	Sin especificar	O157:H7	2 (1 con SUH) (+2 asintomáticos)

Lugar-Referencia	Año	Afectados Situación	Serotipos Verotoxinas Fagotipos	Nº Afectados
Valencia Soler Crespo <i>et al.</i> 2000	1999	Turistas en urbanización	O157:H7	4 (3 con SUH)
Barcelona Anónimo, 2001 Muniesa <i>et al.</i> 2003	2000	Niños de tres Colegios	O157:H7 VT2 Fagotipo 2	175 (6 con SUH)
Lugo Blanco M. <i>et al.</i> 2004d	2003	Brote familiar	O157:H7 VT1VT2 Fagotipo 8	3
Lugo Blanco M. <i>et al.</i> 2004d	2003	Brote familiar	O26:H11 VT1	4
Cáceres Martínez <i>et al.</i> 2009	2007	Sin especificar	O157:H7 VT1 VT2- Fagotipo 14	3
Sin especificar Instituto de salud Carlos III, 2013a	2010	Sin especificar	O157:H7	48 (sin especificar)
Sin especificar Instituto de salud Carlos III, 2013b	2011	Sin especificar	O157:H7	Sin especificar
Sin especificar Instituto de salud Carlos III, 2015	2012	Sin especificar	O157	8 (sin especificar)
Sin especificar Instituto de salud Carlos III, 2015	2012	Sin especificar	O111	2 (sin especificar)

Tanto a nivel mundial, como en España en particular (Tabla 18 y Tabla 19), se puede observar como los ECVT O157 son responsables de la mayoría de los brotes. No obstante, a nivel mundial se observa una diferencia significativa entre grandes y pequeños brotes, de esta manera, las cepas ECVT no O157 responsables de provocar grandes brotes (≥ 100 casos), pertenecen a un número limitado de serogrupos (6 serogrupos distintos) (Tabla 16), entre los que destaca el O111 con un 16,2%; por el contrario, las cepas ECVT no O157 responsables de brotes pequeños (< 100 casos), pertenecen a un grupo más amplio de serogrupos (14 serogrupos distintos), destacando el ECVT O26 (12,6%) y el O111 (7,9%) (Tabla 17) (Doyle *et al.* 2006). Por otro lado, observamos que en lo que se refiere a casos esporádicos, la prevalencia entre ECVT O157 y no O157 es muy similar, llegando incluso a ser los no O157 predominantes (Tabla 19) (EFSA/ECDC, 2014; Crim *et al.* 2014).

Tabla 19. Relación entre ECVT O157 y no O157 asociados a brotes y casos aislados (EFSA/ECDC, 2014; Crim *et al.* 2014)

	Área	Periodo	Total	O157	no O157
Grandes brotes (>100 casos)	Mundial	1982-2010	34	70,6%	29,4%
Pequeños brotes (<100 casos)	Mundial	1982-2010	253	70,8%	29,2%
Casos aislados	EE.UU.	2013	1.113	49,6%	50,4%
	Europa	2012	3.558	55%	45%

Comparando la incidencia de los dos grupos de ECVT (O157 y no O157) en distintos brotes, podemos observar que los brotes provocados por cepas no O157 se asocian con menor frecuencia a consumo de carne, agua y productos agrícolas y parecen estar más atribuidos a contagios persona-persona o vías desconocidas. Mientras que los brotes provocados por ECVT O157 están claramente relacionados con el consumo de carne y agua. Estas diferencias pueden ser debidas, en parte, a que los métodos analíticos disponibles para detectar los ECVT O157 están más desarrollados, de ahí que el porcentaje de brotes asociados a ECVT no O157 por causas desconocidas sea tan elevado (Doyle *et al.* 2006) (Figura 12).

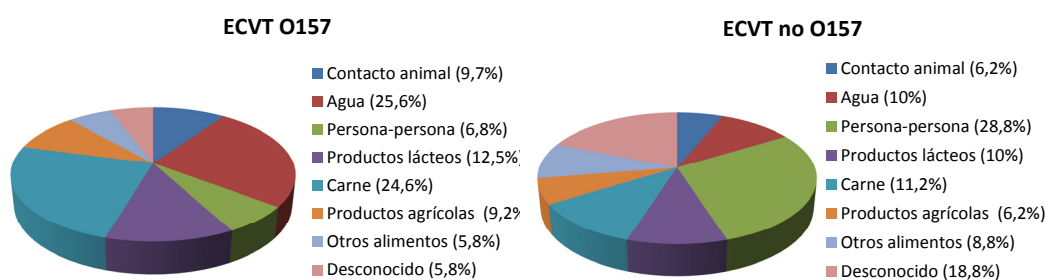


Figura 12. Origen de brotes a nivel mundial asociados a ECVT O157 y no O157 (Doyle *et al.* 2006)

1.4.2.1.1. *E. coli* O104:H4 y “la crisis del pepino”

El 19 de Mayo de 2011, el Instituto Robert Koch (Autoridad Nacional de Salud Pública de Alemania) fue informado de un grupo de 3 casos de SUH en niños ingresados el mismo día en el Hospital Universitario de la ciudad de Hamburgo. El 20 de Mayo de 2011, un equipo del mismo instituto se desplazó a Hamburgo para ayudar en las labores de investigación. Rápidamente se dieron cuenta de la magnitud del brote, ya que el número de casos era muy superior al pensado, y también había casos en adultos y en otras zonas de Alemania, especialmente en el área del norte. Inmediatamente se inició una investigación a todos los niveles, de salud pública y de seguridad alimentaria, para identificar la causa del brote y poder así prevenir futuras infecciones (Frank *et al.* 2011).

El brote creció dramáticamente desde el 8 de Mayo de 2011, llegando a su punto máximo (tanto de casos de SUH como de gastroenteritis) entre los días 21 y 22 de Mayo respectivamente (Figura 13).

En total se reportaron 3.816 casos de infección en seres humanos, de los cuales 845 (22%) desarrollaron SUH y 36 fallecieron (4,2%) y 2.971 casos de gastroenteritis de los que 18 fallecieron (0,6%). En total perdieron la vida 54 personas (Frank *et al.* 2011; ECDC, 2013). Casi simultáneamente se produjo otro brote mucho más pequeño en Burdeos (Francia), con 15 casos de diarrea sanguinolenta, de los cuales 9 progresaron a SUH (Frank *et al.* 2011). En ambos casos se trataba de la misma cepa, un *E. coli* productor de verotoxina VT2, enteroagregativo y del serotipo O104:H4.

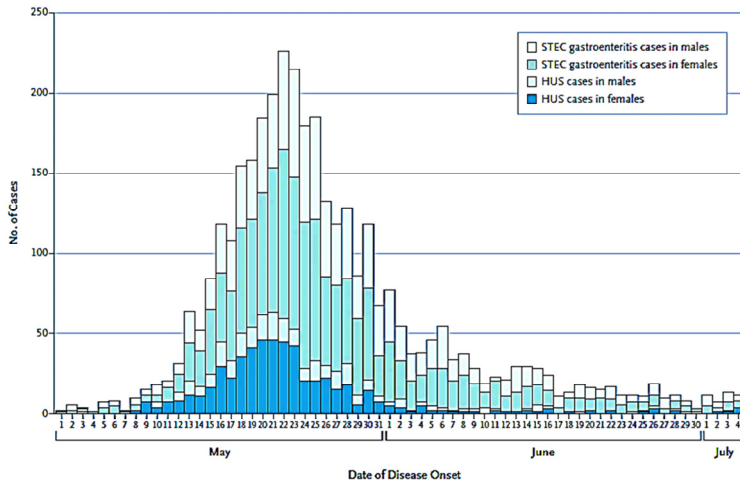


Figura 13. Curva epidemiológica del brote (Frank *et al.* 2011)

Según datos del ECDC, en otros 13 países de la UE se produjeron 49 casos de SUH y 76 casos de diarrea/CH, incluidos los 9 casos de SUH del brote de Francia y 2 casos esporádicos en España. Además, también se detectaron algunos casos en EE.UU. y Canadá. En general, con raras excepciones, todos los casos producidos en el resto de Europa, EE.UU. y Canadá, están vinculados a viajes al norte de Alemania, donde ocurrió el brote principal (ECDC, 2011; Devaux *et al.* 2015).

El 26 de Mayo de 2011, las autoridades alemanas, a través de la consejera de Salud de Hamburgo, cometieron un grave error al acusar precipitadamente a los pepinos producidos en Andalucía como causantes del brote. Se basaban en las encuestas epidemiológicas que implicaban inicialmente a tomates, pepinos y semillas germinadas, y en el hecho de haber aislado una cepa de ECVT de un pepino de origen español del mercado de Hamburgo. Además, la UE lanzó ese mismo día una alerta responsabilizando a España como origen del brote, antes de que el Laboratorio de Referencia de *E. coli* para alimentos alemán determinase el serotipo de la cepa aislada de los pepinos

españoles. Inmediatamente después de las acusaciones de las autoridades alemanas contra los pepinos de origen español, el LREC realizó un análisis de los mismos demostrando la ausencia de la cepa ECVT-ECEA O104:H4 en las muestras de pepinos producidos en Andalucía, señalados errónea e injustificadamente como sospechosos de ser el vehículo del brote alemán (Mora *et al.* 2011b, Blanco, 2012).

Posteriormente, se comprobaría que la cepa encontrada en los pepinos andaluces pertenecía a otro serotipo (O8:H19) incluido en el seropatótipo E (cepas de bajo riesgo según la clasificación de Karmali y colaboradores, 2003). Finalmente, la Comisión Europea, levantó la alerta sobre los pepinos procedentes de Almería el 1 de junio de 2011.

Las acusaciones de las autoridades alemanas a los productos españoles trajeron graves consecuencias a nivel económico para el sector agrario español, con pérdidas para las exportaciones de hortalizas y el consumo interno español difícilmente cuantificables. La Federación Española de Productores Exportadores de Frutas y Hortalizas (FEPEX), totalizó en 589,5 millones de euros las pérdidas producidas como consecuencia de la mala gestión de la “crisis del pepino”.

Una vez descartados los productos españoles como el origen de los brotes, la investigación principal se centró en determinar el vínculo en común entre los brotes de Alemania y Francia.

El 23 de junio se confirma la relación entre ambos brotes, gracias a la comparación de los datos de trazabilidad del brote alemán y del brote francés, que determinó que un lote de semillas de fenogreco importadas de Egipto, era el vínculo en común entre ambos (EFSA, 2011b).

Finalmente, el 5 de julio de 2011 se declaró oficialmente cerrado el brote y al día siguiente, la Comisión Europea prohibió la comercialización de semillas de fenogreco y de otras semillas provenientes de Egipto. Sin embargo, el Instituto Robert Koch de Alemania, mantuvo una estrecha vigilancia del brote hasta el 31 de diciembre de 2011. Durante este periodo, se registraron 33 nuevos casos. Principalmente durante los dos meses siguientes al final del brote (Frank *et al.* 2014).

Uno de los datos más sorprendentes del brote fue la edad de los afectados, en su mayoría adultos, en contraste con lo observado en brotes y casos esporádicos por ECVT clásicos. También llamó la atención la elevada prevalencia de mujeres afectadas que desarrollaron SUH (68%) (Frank *et al.* 2011).

La cepa implicada en este gran brote resultó ser una *E. coli* productora de VT2, perteneciente al serotipo O104:H4 y con factores de virulencia comunes con los *E. coli* enteroagregativos. Se trataba, por tanto, de una cepa atípica en muchos aspectos (Blanco, 2012):

- Híbrida de dos patotipos, por ser a la vez enteroagregativa y verotoxigénica productora de VT2a. La combinación de genes de virulencia de estos patotipos no es frecuente. Únicamente se había observado en una cepa O111:H2 responsable de un pequeño brote en niños con SUH ocurrido en Francia en 1992 (Morabito *et al.* 1998) y más recientemente en una cepa O111:H21 productora de VT2c responsable de un pequeño brote familiar con SUH en el Reino Unido en 2012 (Dallman *et al.* 2012).
- Serotipo (O104:H4) y secuencia tipo (ST678), raramente observados en pacientes humanos y nunca descritos en cepas aisladas de animales ni de alimentos. Existen referencias de este serotipo en cepas enteroagregativas y productoras de VT2 aisladas en Alemania en 2001 (Mellmann *et al.* 2008), Georgia en 2009 (Scheutz *et al.* 2011), Italia en 2009 (Scavia *et al.* 2011), Finlandia en 2010 (Scheutz *et al.* 2011) y Francia (Scheutz *et al.* 2011); Otra cepa aislada en Corea en 2005 productora de VT1 y VT2 (Bae *et al.* 2006); y de cepas del serotipo O104:H4 enteroagregativas aisladas en la República Centroafricana entre los años 1995 y 1996 (Bielaszewska *et al.* 2011), en Dinamarca en 2000 (Scheutz *et al.* 2011), en Mali en 2009 (Scheutz *et al.* 2011), y en España en 1996 (Mora *et al.* 2011b) y en 2014 (Iglesias, Tesis Doctoral pendiente de defensa).
- No portadora de la isla de patogenicidad cromosómica LEE, que incluye el gen *eae* que está presente en las cepas de ECVT más virulentas de los seropatotipos A y B.
- También se diferencia de la mayoría de las cepas de ECVT en que es multirresistente, siendo productora de BLEE del tipo CTX-M-15, también presente en el clon intercontinental de *E. coli* O25:H4-ST131.

- Además de genes de virulencia de ECVT y ECEA, la cepa posee algunos factores de virulencia de *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC).

La teoría más extendida es que la cepa del gran brote alemán sea de origen humano, que haya emergido recientemente a partir de una cepa enteroagregativa del serotipo O104:H4 y que haya adquirido un fago portador del gen *vt2a* a partir de una cepa ECVT. A partir de otra cepa adquiriría el plásmido que codifica para el enzima CTX-M-15. Todo esto se deduce después de comparar el genoma completo de varios aislados de la cepa del brote alemán con el genoma de cepas enteroagregativas del serotipo O104:H4 y de otros serotipos, y con el genoma de cepas de otros de *E. coli* diarreagénicos (ECET, ECEP, ECEI) (Mora *et al.* 2011b).

1.4.3. Supervivencia y crecimiento de ECVT O157 y no O157 en alimentos

Al contrario de la inmensa mayoría de las cepas de esta especie y del resto de cepas de ECVT, las cepas verotoxigénicas del serotipo O157:H7 no fermentan el sorbitol y son β -glucuronidasa negativas, lo que hace más fácil su identificación tanto en alimentos como en muestras clínicas.

A diferencia de la mayoría de los patógenos asociados a alimentos, el ECVT O157 es **extremadamente tolerante al ambiente ácido** (Benjamin y Datta, 1995). El bajo pH del estómago (pH 1,5 a 3) es uno de los primeros mecanismos de defensa contra una infección alimentaria por patógenos entéricos. La habilidad para sobrevivir en medio ácido aumenta las posibilidades de la bacteria de colonizar el intestino y provocar la infección. Esta ácido-resistencia está asociada a dosis infectivas muy bajas.

Estudios experimentales han demostrado que el ECVT O157 es capaz de sobrevivir en las condiciones de fermentación, secado y almacenamiento del salchichón (pH 4,5) durante un periodo de hasta dos meses a 4 °C (Glass *et al.* 1992). Zhao y Doyle (1994), demostraron que el ECVT O157 cuando era inoculado en mayonesa (pH 3,6-3,9) a una concentración elevada, sobrevivía durante 5 a 7 semanas a 5 °C, y durante 1 a 3 semanas a 20 °C. En zumo de manzana (pH 3,6-4,0) conseguía sobrevivir durante 10-31 días a 8 °C y 2-3 días a 20 °C (Zhao *et al.* 1993).

Diferentes estudios han determinado que el ECVT O157 posee tres sistemas de ácido-resistencia eficientes. El primero requiere el factor sigma RpoS y represión de la glucosa. El segundo, requiere adicción de arginina durante la exposición del medio ácido. Y el tercero requiere glutamato para protegerse del pH bajo. Estos tres sistemas son solapantes, pero el control y requerimientos de la actividad ácido-resistente es diferente en cada uno de ellos (Benjamin y Datta, 1995; Castaine-Cornet *et al.* 1999; Lim *et al.* 2010).

De la misma manera, estudios comparativos sobre la ácido-resistencia de cepas ECVT O157 con cepas no O157 no han encontrado diferencias significativas en cuanto a este factor (Large *et al.* 2005). A pesar de ello, no hay suficientes datos sobre serogrupos específicos asociados a graves patologías. No obstante, sí se conoce que la tasa de supervivencia de los diferentes serotipos de ECVT presenta un amplio rango. Mckellar y Knight (1999) encontraron que cepas de ECVT no O157 asociadas a brotes eran más ácido-tolerantes que cepas de origen humano o animal, lo que sugiere que al igual que con las ECVT O157, la ácido resistencia de las cepas ECVT no O157 puede ser un factor que contribuya a su patogenicidad.

E. coli presenta una **rápida adaptación a las bajas temperaturas**. Después de bajar la temperatura de 37 °C, se inducen dos tipos de proteínas (proteínas de clase I y de clase II) que intervienen en la adaptación de las células al choque de frío (Phadtare *et al.* 1999). También se ha descrito un factor desencadenante (TF, trigger factor) que se induce 2-3 h después del choque de frío y potencia la capacidad de sobrevivir a bajas temperaturas (Kandrod *et al.* 1997; Phadtare *et al.* 1999).

El almacenamiento a bajas temperaturas es la base principal de la conservación de los alimentos, son muchos los esfuerzos que se han empleado en el estudio del comportamiento de *E. coli* en esas condiciones y en conocer la temperatura mínima de crecimiento (Van Derlinden *et al.* 2008). Se estima que la temperatura mínima de crecimiento de cepas de *E. coli* tanto patógenas como no patógenas ronda entre 5,5 °C y 10 °C (Shaw *et al.* 1971; Palumbo *et al.* 1995; Kauppi *et al.* 1996; Jones *et al.* 2003; Tamplin *et al.* 2005). Este rango muestra la variabilidad que existe con respecto a la temperatura mínima de crecimiento, que es debida, en parte, a las diferencias en la

composición de los medios utilizados para su estudio (Kauppi *et al.* 1996).

Tamplin y colaboradores (2005) observaron que los medios de cultivo sintéticos no siempre son representativos para la descripción del comportamiento de *E. coli* en alimentos, por lo que el comportamiento de *E. coli* a temperaturas de refrigeración debe ser estudiado específicamente para cada producto. Doyle y Schoeni (1984) determinaron que el ECVT O157 era capaz de sobrevivir en carne picada a -20 °C durante meses sin apenas alterar sus recuentos. También se ha observado que en carne de cerdo *E. coli* es capaz de crecer a temperaturas que rondan los 9 °C (Gill *et al.* 1998), y que en carne de ave, ECVT O157 es capaz de sobrevivir y crecer a temperaturas entre 0,6 °C y 12 °C (Arias *et al.* 2001). Las cepas de ECVT O157 también parecen crecer en vegetales envasados y refrigerados a 0,6 °C y 12 °C (Ruscica y Sobol, 1998; Arias *et al.* 2001). Eribo y Ashenafi (2003) observaron que en tomate y productos derivados de éste, no solo los ECVT O157 eran capaces de sobrevivir varios días, sino que también, la supervivencia se hacía notablemente más prolongada a temperaturas de refrigeración. Marek y colaboradores (2004) analizaron la supervivencia de *E. coli* en suero para la elaboración de queso Cheddar y observaron que los ECVT O157 eran capaces de sobrevivir a 4 °C de 14 a 21 días en sueros de leche sin pasteurizar y hasta 28 días en sueros de leche pasteurizada. Massa y colaboradores (1999) reportaron un aumento de la población viable de EHEC inoculada en leche y almacenada a 8 °C, sin embargo a 22 °C observaron una disminución de la misma.

Durante el almacenamiento de productos a temperaturas relativamente altas (15 °C-22 °C), se observa una marcada disminución de la población de *E. coli*. Mientras que temperaturas inferiores parecen protegerla. Existen estudios que indican que la supervivencia de *E. coli* aumenta a medida que la temperatura decrece (Erickson y Jenkins, 1991; Radford y Board, 1993; Erickson *et al.* 1995; Linton *et al.* 1995; Skandamis *et al.* 2000). Este hecho, coincide con algunos estudios que han reportado que la supervivencia de *E. coli* en agua se ve potenciada a bajas temperaturas (Brettar y Höfle, 1992; Smith *et al.* 1994; Bogosian *et al.* 1996; Sampson *et al.* 2006).

Afortunadamente, los ECVT **no presentan una especial termotolerancia**, por lo que se puede conseguir de manera efectiva su inactivación por calor. En el caso de la carne

picada, si se calienta suficientemente como para inactivar *Salmonella*, se consigue también la inactivación del ECVT O157. La presencia de grasa incrementa la tolerancia térmica del ECVT O157 (Line *et al.* 1991). En el caso de la leche, la pasteurización también ha resultado ser un tratamiento efectivo para matar más de 10^4 células del ECVT O157 por mililitro. Por lo tanto, el calentamiento adecuado de los alimentos de origen animal, alcanzando una temperatura interna de al menos 68,3 °C durante 40 s (Clavero *et al.* 1998), es un punto crítico de control (PCC) a tener en cuenta a la hora de asegurar la inactivación del ECVT O157.

Existen pocos datos en la literatura científica sobre el grado de termotolerancia de los ECVT no O157. Sin embargo, en 2011, el Food Safety and Inspection Service de los EE.UU. (USDA), realizó un estudio en el que examinaba la resistencia térmica de ECVT O157 y no O157 (un grupo compuesto de ECVT de los serogrupos O45, O103, O111, O121 y O145) inoculados a carne de vacuno, y determinaron que el tiempo de cocción y la temperatura efectiva para inactivar las cepas de ECVT O157 eran igual de efectivas contra las otras 6 no O157 añadidas (Luchansky *et al.* 2014).

1.4.4. ECVT en carnes

Los tejidos magros proporcionan fuentes de energía fácilmente disponibles para las bacterias y un valor de pH adecuado (habitualmente entre 5,5-5,7; tanto para carne de vacuno, cerdo y pollo), por lo que se dan las condiciones idóneas para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Reginfo-Gonzales y Ordoñez-Gomez, 2010).

Al ser el ganado bovino el principal reservorio de los ECVT, la presencia de este tipo de patógenos se detecta, fundamentalmente, en carne de vacuno, pero aparecen también a un nivel importante en la mayoría de los tipos de carne de consumo. Se acepta, en general, que la presencia de ECVT en carne de origen no bovino es debida, en la mayoría de los casos, a una contaminación secundaria producida por una mala manipulación del alimento (Knight, 1993). Como la carne se consume habitualmente cocinada, el tema de mayor preocupación es la contaminación cruzada de otros alimentos (Mora, 2002).

Todos los eslabones de la cadena alimentaria juegan un papel fundamental en la contaminación final de la carne, desde las explotaciones, mataderos, salas de despiece y fábricas de productos elaborados, hasta los puntos de venta al público, establecimientos de elaboración de comidas preparadas (incluso a nivel doméstico), pasando por las distintas cadenas de transporte. No obstante, de todos estos puntos del ciclo de producción y cocinado de la carne, son los mataderos los que juegan el papel más relevante a la hora de determinar la carga microbiológica de este alimento, ya que como hemos indicado anteriormente, es durante las operaciones de desuello, despiece, y sobretodo evisceración, donde se produce la mayor tasa de contaminación.

La función de los mataderos es la de producir carne higiénica y organolépticamente aceptable mediante la manipulación humana de los animales en lo que respecta al empleo de técnicas higiénicas para el sacrificio de los mismos y la preparación de canales mediante una división estricta de operaciones “limpias” y “sucias”. Al mismo tiempo deben facilitar la inspección adecuada de la carne y el manejo apropiado de los desechos resultantes, para eliminar todo peligro potencial de que la carne en mal estado pueda llegar al consumidor o contaminar el medio ambiente (FAO, 1993). Sin embargo, ya que el origen de la mayoría de los patógenos en las carnes son los intestinos de los propios animales, la contaminación de ésta se puede producir por la diseminación de las heces durante las operaciones de sacrificio, debido a técnicas deficientes en el matadero que permitan la contaminación de las mismas o de las instalaciones con el contenido intestinal. También se presta mucha atención a los manipuladores de la carne como fuente de patógenos, aunque existen otras fuentes de patógenos para los productos cárnicos (roedores, deposiciones de aves, insectos, e incluso perros); no obstante, su presencia sería indicativa de prácticas extremadamente deficientes. La contaminación por agua sigue siendo una posibilidad, especialmente cuando se utiliza agua de tanques o pozos en vez de agua de la red (Mora, 2002; Iglesias *et al.* 2006).

En las salas de despiece, las canales son troceadas en piezas enteras y recortes, que se destinan a su comercialización en fresco o como materia prima para las fábricas de elaborados. La transformación de piezas de carne en productos cárnicos elaborados mediante procesos como: picado, amasados, ahumados etc., da lugar a una serie de

productos finales elaborados (cocidos, ahumados y frescos) que tendrán una carga microbiana distinta, y que variará en función de la carga inicial y de los procesos a los que hayan sido sometidos durante su elaboración.

En la carne fresca, la contaminación microbiana localizada inicialmente en la superficie puede extenderse al resto del producto durante su procesado (deshuesado, despiece, fileteado, etc.). En estos casos, las zonas de corte se convierten en un medio de cultivo ideal para los microorganismos patógenos y alterantes por lo que deben controlarse estrechamente las condiciones higiénicas de las superficies en contacto con ellos durante estas etapas (García *et al.* 2006).

Teóricamente, un número muy amplio de bacterias puede crecer sobre la carne; en la práctica, se aplican factores extrínsecos como la refrigeración y el envasado en atmósferas protectoras como el vacío, las atmósferas controladas, y las atmósferas modificadas, que limitan la intensidad del crecimiento microbiano y el número de cepas que son capaces de crecer. Además, la competición es un factor clave adicional que limita el número de tipos de microorganismos que se desarrollan.

El envasado en atmósfera modificada, se utiliza frecuentemente para piezas cárnicas de pequeño tamaño, y tiene como objetivo mantener la calidad sensorial de estos productos y prolongar su vida comercial. Implica la eliminación del aire del envase seguida de la inyección de un gas o mezcla de gases seleccionados de acuerdo a las propiedades del alimento, generando un ambiente gaseoso óptimo para la conservación del producto, donde el envase ejerce de barrera y aísla, en mayor o menor grado, dicho ambiente de la atmósfera externa. Los gases más utilizados son el oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno que ejercen su acción protectora solos o combinados en una proporción distinta a la que presentan en la atmósfera terrestre (Tabla 20) (García *et al.* 2006).

Tabla 20. Composición de la atmósfera modificada recomendada para distintos productos cárnicos (García *et al.* 2006)

Producto	Composición de la atmósfera modificada (%)	Tª de almacenamiento (°C)	Vida útil
Carne fresca	65-80 O ₂ /20-35 CO ₂ /Resto N ₂	0-4	6-8 días
Elaborados cárnicos frescos	5-30 O ₂ /20-30 CO ₂ /Resto N ₂	0-4	hasta 4 semanas
Productos avícolas	20-70 O ₂ /30-50 CO ₂ /Resto N ₂	0-4	Hasta 2 semanas

Uno de los principales inconvenientes de la utilización de las atmósferas modificadas, es que ésta conlleva ciertos riesgos biológicos y su efecto sobre el crecimiento de algunas bacterias patógenas de transmisión alimentaria aún necesita ser evaluado (AESAN, http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/otras_actividades/UIMP_seg_alimentaria_nutricion/Maria_Luisa_Garcia_Lopez.pdf).

El comportamiento de las bacterias patógenas en los alimentos envasados en atmósfera modificada depende de una serie de parámetros interrelacionados, destacando entre ellos: la temperatura de almacenamiento, la composición de gases en la atmósfera y la microbiota competitiva (Farber, 1991; Samelis *et al.* 2000).

En relación con la temperatura, teóricamente el frío impedirá el crecimiento de las bacterias mesófilas como los *E. coli*. Sin embargo, durante el almacenamiento, distribución y venta existen oportunidades para su multiplicación cuando se rompe la cadena del frío. Estas rupturas en la cadena de frío provocan fluctuaciones de temperatura que permiten que las bacterias mesófilas, como ECVT y otros patógenos, puedan multiplicarse en atmósfera modificada. Este hecho no es infrecuente, especialmente durante el transporte (tanto desde matadero y salas de despiece a los puntos de comercialización, como desde éstos a los hogares), y en los expositores y frigoríficos domésticos, e incluso cuando se controla adecuadamente la temperatura, porque se producen aumentos cíclicos de la misma durante el “desescarche”. De esta manera, con este tipo de envasado y mantenida la carne a 5 °C, juegan un papel destacado las enterobacterias, por lo que si se rompe la cadena de frío, y al inhibir el crecimiento de otros microorganismos competitivos, pueden multiplicarse con facilidad. Por lo tanto, el crecimiento de *E. coli* en carne de vacuno conservada en atmósfera modificada depende, en gran medida, de la carga inicial del microorganismo en el alimento antes del envasado.

Desde el punto de vista de la salud pública, también preocupa el comportamiento de las bacterias patógenas capaces de multiplicarse en condiciones reducidas de oxígeno, como es el caso de los ECVT. En general, la acción inhibidora del CO₂ varía según el microorganismo. En este caso, *E. coli* al ser una especie anaerobia facultativa pueden verse inhibida, enlentecida o potenciada. Esto es importante porque la composición de las atmósferas modificadas está diseñada, principalmente, para inhibir los microorganismos

alterantes que manifiestan cambios sensoriales indeseables en el color, textura, sabor y olor, aumentando así la vida útil del alimento, esto provoca que los patógenos puedan multiplicarse hasta niveles peligrosos antes de que los microorganismos alterantes hayan alcanzado valores asociados con la alteración y, por tanto, un alimento “aparentemente fresco” puede resultar peligroso. Preocupa, asimismo, el lento crecimiento de la microbiota alterante porque ésta, en condiciones de aerobiosis, puede ser un potente competidor. Una preocupación adicional es el efecto que sobre los patógenos pueden ejercer el prolongado almacenamiento y la microbiota (número y tipo) que se desarrolla en el producto (Tamplin, 2002). El efecto de la interacción entre la microbiota residente o alterante y las bacterias patógenas de *E. coli* necesita ser más estudiado (Iglesias *et al.* 2006; AESAN, http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/otras_actividades/UIIMP_seg_alimentaria_nutricion/Maria_Luisa_Garcia_Lopez.pdf).

Por todo esto, queda claro que cada tipo de carne, el control en matadero, el posterior despiece, así como su procesado y métodos de conservación juegan un papel fundamental en cuanto a la prevalencia de ECVT con la que llega la carne al consumidor.

1.4.4.1. ECVT en carne de vacuno

Durante el proceso productivo de la carne de origen vacuno existen varias fases que se pueden considerar críticas a nivel microbiológico (Figura 14) (CAR/PL, 2006).

- Durante el transporte, recepción y estabulación el principal riesgo es una posible bajada de defensas de los animales, haciéndolos más susceptibles a contraer enfermedades, así como la contaminación superficial por heces, y la contaminación cruzada entre animales sanos y enfermos (Rasmussen *et al.* 1993; Cray *et al.* 1998).
- En el desangrado (generalmente para el ganado vacuno se aplica el desangrado vertical) se corre el riesgo de que la sangre pueda contaminarse por la caída de heces, orina, suciedad o contenido gástrico.
- En el desuello el principal riesgo es que la piel del animal entre en contacto con el músculo mientras se está retirando.
- La evisceración supone una de las operaciones más críticas desde el punto de vista

higiénico, ya que consiste en la extracción de las vísceras torácicas, preestómagos, estómagos, intestino, bazo e hígado de la cavidad abdominal, durante esta etapa es fundamental evitar la posible contaminación de la canal por roturas del estómago o intestino.

- Durante el corte de la canal es crítico evitar contaminación desinfectando adecuadamente el instrumental, así como establecer una temperatura límite de trabajo inferior a 12 °C.
- El lavado de las canales, que se realiza con agua para eliminar restos de sangre, grasa y restos de esquirlas de huesos del seccionado de la canal, reduce el nivel de microorganismos que la contaminan de forma superficial, sin embargo, el riesgo real lo supone el empleo de agua contaminada y la posibilidad de provocar un posible exceso de humedad superficial.

• Durante el oreo, que consiste en reducir la temperatura de la canal lo más rápidamente posible, resulta fundamental controlar el crecimiento microbiano de la canal y los cambios organolépticos. En este punto, las canales refrigeradas pueden ser congeladas, enviadas directamente a expedición y al punto de venta al consumidor, o bien, ser destinadas a las salas de despiece.

- El despiece supone otro punto crítico, ya que según la carga inicial con la que lleguen las canales, se podrían diseminar fácilmente los patógenos durante el corte, por lo que es fundamental la desinfección adecuada del instrumental y realizar el despiece en salas refrigeradas donde se mantenga una temperatura de 12 °C.

Al igual que las canales, en función de si su envío al mercado es inmediato o a medio plazo, las piezas pueden ser refrigeradas o congeladas. En otros casos, el destino de las

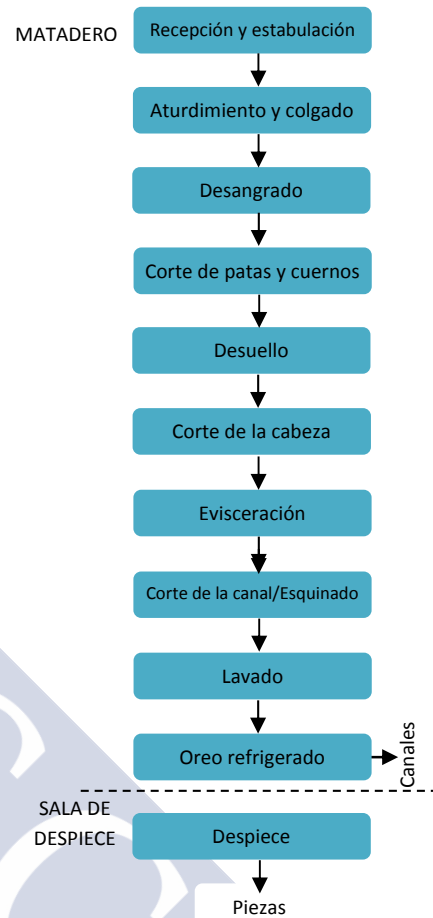


Figura 14. Diagrama de flujo del proceso productivo de la carne de origen vacuno (CAR/PL, 2006)

piezas pueden ser las industrias de elaborados cárnicos. Es fundamental a partir de este punto, que no se produzcan rupturas en la cadena de frío.

Durante la elaboración de estos productos, nos encontramos con una de las operaciones más críticas desde el punto de vista higiénico: el picado. La carne picada es más susceptible de contaminarse microbiológicamente por el hecho de que aumenta la superficie de contacto o de exposición a los microorganismos. Por este motivo, la carne picada, y por extensión las hamburguesas, resultan especialmente peligrosas, ya que al encontrarse los microorganismos en toda su masa, no es suficiente con calentar la parte superficial. Hasta el punto que en los países anglosajones a la CH provocada por el consumo de hamburguesas se le conoce como *la enfermedad de las hamburguesas*, debido al elevado número de brotes provocados por el consumo de éstas (Doyle *et al.* 1997; Sheridan y McDowell 1998; Meng *et al.* 1998; De Boer y Heuvelink, 2001; Nissen y Nesbakken, 2001; Muehlherr *et al.* 2003).

Durante el proceso de picado se debe controlar la temperatura de la masa (entre 1 °C y 7 °C) para evitar el crecimiento microbiano. La maquinaria para el picado puede estar refrigerada para evitar que la fricción de las máquinas aumente excesivamente la temperatura. Por otro lado, el amasado que se puede hacer conjuntamente con el picado o en máquinas que trabajan al vacío, en donde la carne picada se mezcla con diferentes aditivos, grasas, especias y otros ingredientes, supone también un punto crítico al diseminar la posible carga del patógeno por toda la masa.

Finalmente, los productos se envasan al vacío o en atmósferas modificadas para contrarrestar la posible contaminación bacteriana que se pudiera haber producido durante la manipulación de los productos.

Por todo esto, está claro que la prevalencia de ECVT en carne de vacuno depende, en gran medida, del control de un gran número de puntos críticos. De esta manera, un fallo en cualquiera de éstos, puede suponer, como veremos a continuación, la exposición al consumidor a cepas de ECVT altamente patógenas, con el consecuente riesgo que esto implica para la salud pública.

Entre los años 1995 y 2009 en el LREC se llevó a cabo varios estudios en los que se

analizó la presencia de ECVT en un total de 1.465 muestras de carne picada de vacuno fresca procedentes de diferentes puntos de venta de la ciudad de Lugo (Tabla 21, Tabla 22, Tabla 23 y Figura 15) (Blanco J.E. *et al.* 1996b, 1996d; Blanco *et al.* 2003; Román, 2002; Mora, 2002; Núñez, 2003; López, 2004; Mora *et al.* 2003, 2007, 2011; Justel, 2005; Losada, 2005; García, 2009; Fernández, 2010; Herrera, 2005, 2008, 2010). Se detectaron ECVT en 153 de las 1.465 muestras (10%), siendo 8 (0,5%) muestras positivas para ECVT O157 y 148 (10,1%) para no O157. En 3 muestras se detectaron tanto ECVT O157 como no O157 (Tabla 21).

Tabla 21. Detección de ECVT O157 y no O157 en carne fresca de vacuno en Lugo (1995-2009)

Año	Muestras	ECVT O157		ECVT no O157		Total	
1995	58	3	5,0%	8	14%	10	17,2%
1996	91	0	0,0%	8	9%	8	8,8%
1997	173	1	0,6%	20	12%	21	12,1%
1998	133	1	0,8%	18	13,5%	18	13,5%
2001	80	1	1,3%	6	7,5%	7	8,7%
2002	20	0	0,0%	1	5,0%	1	5,0%
2003	230	2	0,9%	29	12,6%	30	13,0%
2005	250	0	0,0%	29	11,6%	29	11,6%
2006	60	0	0,0%	5	8,3%	5	8,3%
2007	100	0	0,0%	9	9,0%	9	9,0%
2008	170	0	0,0%	11	6,4%	11	6,4%
2009	100	0	0,0%	4	4,0%	4	4,0%
Total	1.465	8	0,5%	148	10,1%	153	10%

En este estudio se observó que la detección de ECVT O157 era nula desde el año 2005 y que la prevalencia de los ECVT no O157 descendía progresivamente desde el año 2003 hasta situarse en el 4% en 2009. Sin embargo, esta prevalencia seguía siendo muy alta y apuntaba a la necesidad de mejorar la higiene, el control y la vigilancia de la cadena alimentaria (Figura 15).

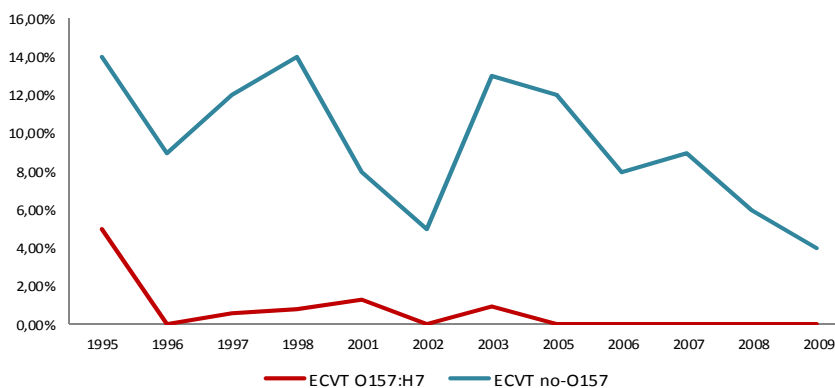


Figura 15. Evolución en la detección de ECVT en carne picada de vacuno fresca en Lugo (1995-2009) (Herrera, 2010)

En la Tabla 22 se especifican detalladamente las características de las 149 cepas de ECVT aisladas de carne de vacuno en la ciudad de Lugo en el periodo 1995-2009.

Tabla 22. Características de las cepas ECVT aisladas de carne de vacuno en Lugo (1995-2009)

Serotipo	Nº de cepas	vt1	vt2	ee	E-hlyA
O1:H20	1	+	-	+ (NR)	+
O1:H20	1	+	-	-	+
O2:H8	1	-	+	-	-
O2:H27	2	-	+	-	-
O2:H29*	1	-	+	-	-
O2:H32	1	-	+	-	-
O2:H-	3	-	+	-	-
O4:H4	1	-	+	-	-
O5:H2	1	+	-	-	-
O5:H- *	1	+	+	+ β 1	+
O5:H- *	2	+	-	+ β 1	+
O6:H10	3	+	-	-	-
O6:H49	1	-	+	-	-
O8:H8	1	+	-	-	-
O8:H9	1	-	+	-	-
O8:H11	1	-	+	-	+
O8:H19*	1	-	+	-	+
O8:H21*	4	-	+	-	-
O8:H31	1	-	+	-	-
O8:H-	2	+	+	-	+
O15:H16	1	-	+	+ β 1	-
O15:H18	1	-	+	-	-
O17:H45	1	-	+	-	-
O20:H2	1	+	-	-	-
O21:H21	1	-	+	-	-
O22:H8*	2	-	+	-	-
O22:H8*	2	+	+	-	+
O26:H8	1	-	+	-	-
O26:H11*	10	+	-	+ β 1	+
O26:H11*	1	+	-	+ β 1	-
O26:H-*	2	-	+	-	-
O26:H42	1	+	-	+ β 1	+
O39:H21	1	-	+	-	+
O42:H21	1	-	+	-	-
O52:H45	1	+	-	-	-
O52:H-	1	+	-	-	-
O54:H21	1	-	+	-	-
O54:H-	1	-	+	-	-
O64:H5	3	+	-	-	-
O75:H8	1	+	-	-	+
O75:H8	1	-	+	-	+
O75:H-*	1	+	+	-	+
O76:H7*	1	-	+	+	+
O77:H41	2	-	+	-	+
O84:HNT	2	+	-	+ ζ	+
O88:H8	1	-	+	-	-
O91:H-*	1	+	+	-	+
O101:H-*	1	-	+	+ (η 1)	+

Serotipo	Nº de cepas	vt1	vt2	eae	E-hlyA
O103:H2*	3	+	-	+ (ε)	+
O103:H-*	1	+	-	+ (ε)	+
O104:H2*	1	+	+	-	+
O110:H-	1	+	-	-	+
O111:H-*	2	+	-	+ (γ2)	+
O112:H2*	1	+	+	-	+
O113:H21*	1	-	+	-	+
O113:H21*	1	-	+	-	-
O116:H16	1	-	+	-	-
O116:H21	1	+	+	-	+
O118:H16*	1	+	-	+ β1	+
O120:H10	1	-	+	-	-
O128:H21	1	+	+	-	-
O128:H31	1	+	-	-	-
O137:H12	1	-	+	-	-
O141:H19	1	-	+	-	-
O145:H-*	1	+	-	+ (γ1)	+
O145:H-*	1	-	+	+ β1	+
O146:H2	1	+	+	+ ζ	+
O146:H2	1	+	+	-	+
O146:H8*	2	-	+	-	-
O146:H21	1	-	+	-	+
O146:H21	5	+	+	-	+
O146:H-	1	+	+	-	+
O153:H4	1	-	+	-	-
O156:H8	1	-	+	+	-
O157:H7*	3	-	+	+ (γ1)	+
O157:H7*	5	+	+	+ (γ1)	+
O159:H-	1	-	+	-	-
O162:H10	1	+	+	-	-
O166:H28	1	+	+	-	+
O167:H2	1	+	-	-	-
O168:H8	1	-	+	-	-
O171:H2	3	-	+	-	-
O174:H10	1	+	+	+ β1	-
O174:H21*	3	-	+	-	-
O174:H-*	2	-	+	-	-
OX178:H16	1	-	+	-	-
ONT:H4*	1	-	+	-	-
ONT:H5	1	+	-	-	-
ONT:H8	1	-	+	-	-
ONT:H19	1	-	+	-	+
ONT:H21	1	+	+	-	+
ONT:H21	1	+	+	-	-
ONT:H21	4	+	-	-	-
ONT:H21	2	-	+	-	-
ONT:H38	1	-	+	-	-
ONT:H-	1	-	+	-	+
ONT:H-*	1	+	-	-	-
ONT:H-*	3	-	+	-	-

NOTA. Los serotipos detectados en pacientes humanos están en negrilla. Los aislados de pacientes con SUH están con un asterisco (*). En rojo los serotipos clasificados como seropatotipos A, B y C.

En cuanto a los resultados obtenidos en los recuentos de *E. coli* por gramo en carne de vacuno en el periodo 1995-2009, se determinó que el porcentaje de muestras con <10 ufc de *E. coli* por gramo en carne de vacuno era tan solo del 65%, y que el porcentaje de muestras con >99 ufc de *E. coli* por gramo también fue superior a lo deseado (12%) (Tabla 23).

Tabla 23. NMP de *E. coli* por gramo en carne de vacuno en Lugo (1995-2009) (Herrera, 2010)

NMP	1995	1996	1997	1998	2001	2002	2003	2005	2006	2007	2008	2009	Total
<i>E. coli</i>	n=58	n=91	n=173	n=133	n=80	n=20	n=230	n=250	n=60	n=100	n=170	n=100	n=1.465
<10	23	45	100	88	65	15	152	167	49	83	108	63	958
	40%	49%	58%	66%	81%	75%	66%	67%	82%	83%	64%	63%	65%
10-99	15	27	44	28	13	3	53	61	8	12	43	23	330
	26%	30%	25%	21%	16%	15%	23%	24%	13%	12%	25%	23%	23%
100-999	12	10	22	8	2	1	16	20	3	4	11	10	119
	21%	11%	13%	6%	3%	5%	7%	8%	5%	4%	6%	10%	8%
>999	8	9	7	9	0	1	9	2	0	1	8	4	58
	14%	10%	4%	7%	0%	5%	4%	1%	0%	1%	5%	4%	4%
>99	20	19	29	17	2	2	25	22	3	5	19	14	177
	34%	21%	17%	13%	3%	10%	11%	9%	5%	5%	11%	14%	12%

Los datos reflejados por la EFSA/ECDC para España contrastan con los obtenidos en el LREC. Durante el periodo 2007-2011, España reportó una prevalencia de ECVT en carne de vacuno del 3,7%, muy por debajo del 10% reportado por el LREC y similar para ECVT O157 (0,3% frente al 0,5%) (Tabla 21 y Tabla 24) (EFSA/ECDC, 2012).

Tabla 24. Prevalencia de ECVT en carne de vacuno en España (2007-2011) (EFSA/ECDC, 2012)

Año	Nº	ECVT	ECVT O157
2007	92	5 (5,4%)	1 (1,1%)
2008	35	0 (0%)	0 (0%)
2009	138	8 (5,8%)	0 (0%)
2010	69	1 (1,4%)	0 (0%)
2011	45	0 (0%)	0 (0%)
TOTAL	379	14 (3,7%)	1 (0,3%)

En lo que respecta a los datos de la EFSA para la UE en carne de vacuno, en el periodo 2007-2012, indican que el porcentaje de muestras positivas para ECVT en general y ECVT O157 en particular es de 0,8% y 0,2%, respectivamente (EFSA/ECDC, 2012, 2013, 2014), valores significativamente inferiores a los detectados en España por el ECED y el LREC (3,7-10% y 0,3-0,5%, respectivamente) (Tabla 24 y Tabla 25).

Tabla 25. ECVT en carne fresca de vacuno en la UE (2007-2012)

Año	Nº	ECVT	O157:H7
2007	14.115	42 (0,3%)	14 (0,1%)
2008	14.810	44 (0,3%)	15 (0,1%)
2009	9.285	213 (2,3%)	65 (0,7%)
2010	8.566	43 (0,5%)	9 (0,1%)
2011	4.347	61 (1,4%)	13 (0,3%)
2012	4.603	60 (1,3%)	5 (0,1%)
TOTAL	55.726	463 (0,8%)	121 (0,2%)

En EE.UU., informes del FSIS (USDA-Food Safety and Inspection Service) del periodo 2001-2005, indican un espectacular descenso del número de muestras positivas para ECVT O157 a partir del año 2002. Se cree que estos resultados son debidos a que ese año el FSIS ordenó a las plantas de producción una reevaluación de sus planes de seguridad alimentaria, por lo que casi todas implantaron y validaron nuevos métodos y técnicas de control para el ECVT O157. Por otro lado, un estudio realizado en el mismo país, sobre 4.133 muestras de carne picada de vacuno procedentes de diferentes suministradores de todo el país, dio como resultado el aislamiento de cepas ECVT no O157 en 300 (7,3% de dichas muestras) (Bosilevac y Koohmaraie, 2011).

En todo caso, los niveles detectados de ECVT en carne de vacuno varían mucho según los países. Por ejemplo, la prevalencia de ECVT en carne de vacuno recogida en distintos establecimientos de Corea es del 0,1% (Lee *et al.* 2009) y el 20% en muestras de carne lista para el consumo en Egipto (Awadallah *et al.* 2014). Por otro lado, la prevalencia de ECVT O157 en Argentina es del 3,8% (Chinen *et al.* 2001), en China 0%-5% (Wang *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2002). En general, se estima que la prevalencia de ECVT O157 en carne de vacuno a nivel mundial oscila entre el 0,1% y el 54% (Hussein y Bollinger, 2005). Asimismo, la prevalencia detectada de ECVT no O157 en carne de vacuno también es muy variable y se estima que en general, la prevalencia de ECVT no O157 en carne de vacuno oscila entre el 2,4% y el 30% (Hussein, 2007).

1.4.4.2. ECVT en carne de porcino

El proceso industrial del ganado porcino es similar al del ganado vacuno en cuanto a la secuencia de operaciones que se llevan a cabo para su sacrificio y la preparación de las canales. La principal diferencia respecto a éste es que la canal de ganado porcino se procesa conjuntamente con la piel del animal, que no es retirada tras el desangrado, por

lo que el riesgo de contaminación es mayor. Por esto, se hace necesario un acondicionamiento de la piel sobre el propio animal que permita retirar la suciedad y los pelos (CAR/PL, 2006).

Además de las fases ya mencionadas en el caso de la carne de origen vacuno, las fases más críticas desde el punto de vista microbiológico del proceso productivo para porcino son (Figura 16) (CAR/PL, 2006):

- El transporte, recepción y estabulación, ya que al procesar la canal con la piel, el ganado porcino sí suele ser lavado en los establos para retirar la suciedad adherida a ésta, por lo que este proceso implica, además, el riesgo de utilizar agua contaminada.
- El escaldado, que se aplica para retirar con más facilidad los pelos de la piel. Para ello, se introducen los animales colgados en tanques de escaldado con agua caliente a 60 °C -62 °C durante 5-6 min. El contacto del animal con el agua debe ser por inmersión o mediante duchas. En el caso de la inmersión, se aporta el agua que se va perdiendo o arrastrando con los animales. En el segundo caso, se puede llegar a cierto grado de reutilización del agua, el riesgo de esta fase está en la utilización de agua contaminada, o en la contaminación de unos animales a otros por reutilización del agua.

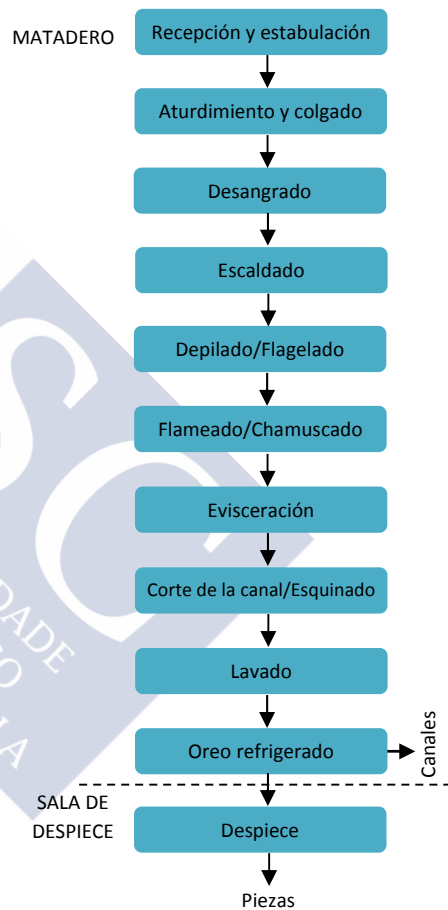


Figura 16. Diagrama de flujo del proceso productivo de la carne de origen porcino (CAR/PL, 2006)

- El depilado suele ser otro punto crítico microbiológico, ya que una vez escaldado el animal, se pueden diseminar fácilmente las bacterias patógenas que hayan quedado en las canales.
- Por este motivo se practica después de estos procesos un flameado o chamuscado,

que tiene como objeto, por un lado, eliminar aquellas partes de la piel que no han sido retiradas en la operación anterior, y por otro, destruir las bacterias presentes en la piel para favorecer la posterior conservación de la canal.

- Al igual que con el ganado vacuno, la fase más crítica desde el punto de vista higiénico suele ser la evisceración. Los utensilios, las manos del manipulador, los cortes y roturas del intestino, tracto intestinal, etc. pueden ser causa y origen de contaminaciones microbianas de la carne. Durante esta etapa conviene ligar el esófago para evitar cualquier contaminación procedente del tracto intestinal.

- Todos estos procesos suponen un aumento de la temperatura corporal de las canales, que en este punto puede ser de unos 40 °C, por lo que es imprescindible reducirla rápidamente para evitar el crecimiento bacteriano, mediante el oreo y refrigeración.

Después las canales serán almacenadas a una Tª entre 0 °C y 4 °C, donde permanecerán hasta su posterior comercialización. En este punto, las canales refrigeradas pueden ser congeladas, enviadas directamente a expedición y al punto de venta al consumidor, o bien ser destinadas a las salas de despiece.

Finalmente, tras el despiece, los productos finales serán envasados, normalmente en atmósfera modificada, para ser enviados a los puntos de venta al consumidor, o al vacío, como materia prima para la producción de alimentos cárnicos elaborados en fresco, curados o embutidos, las consecuencias y puntos críticos microbiológicos de estos procesos son los mismos que en el ganado vacuno.

Al igual que con la carne de vacuno, el procesado de la carne de porcino conlleva un gran número de puntos críticos, sin embargo, al no considerarse al ganado porcino reservorio natural de ECVT, la prevalencia de estas cepas en este tipo de carne depende, principalmente, de las contaminaciones cruzadas que puedan producirse, no solo a nivel industrial, sino también, a nivel comercial y doméstico.

Al igual que en el caso de la carne de vacuno, la prevalencia de ECVT en carne de porcino varía mucho de unos países a otros, variando también en función del tipo de producto cárnico que se muestree (canal, pieza cárnica, carne picada, etc.) y de la metodología empleada en la detección de ECVT.

En un estudio llevado a cabo en un matadero en Alberta, Canadá, entre los años 2006 y 2007, se detectó una prevalencia de ECVT del 4,8% en 1.067 canales de porcino analizadas (Bohaychuk *et al.* 2011). En Corea, Lee y colaboradores (2009) analizaron 1.350 muestras de carne de cerdo adquiridas en distintos establecimientos de diferentes provincias durante 2004-2006, y solo aislaron ECVT del 0,3% de las muestras analizadas. Sin embargo, en China, en un estudio realizado entre 2010-2012, Wang y colaboradores (2014) aislaron ECVT O157 en 3 de 140 (2,1%) muestras de carne de cerdo. En este mismo país, Bai y colaboradores (2015) aislaron ECVT en 14 de 318 (4,4%) de las muestras de carne de cerdo recogidas de supermercados en 2 ciudades chinas entre 2013-2014.

Durante el periodo 2007-2011, 11 países de la UE reportaron al ECDC datos de la presencia de ECVT en carne de porcino. De un total de 17.787 muestras analizadas, la prevalencia durante ese periodo para ECVT en general fue del 0,3%, y de 0,04% para ECVT O157 (Tabla 26) (EFSA/ECDC, 2012). El ECVT O157 fue detectado en 3 países (Italia, Holanda y España) y el porcentaje más alto lo reportó España (1,2%) en 2009.

Tabla 26. Prevalencia de ECVT en carne de cerdo en la UE (2007-2010) (EFSA/ECDC, 2012)

Año	Nº	ECVT	ECVT O157
2007	5.057	10 (0,2%)	6 (0,1%)
2008	5.672	7 (0,1%)	0 (0%)
2009	3.479	27 (0,8%)	1 (0,03%)
2010	3.579	9 (0,3%)	1 (0,03%)
TOTAL	17.787	53 (0,3%)	8 (0,04%)

En el año 2011, a nivel europeo, solo hay datos de la República Checa, donde analizaron 1.395 muestras y no encontraron ninguna positiva para ECVT.

Aunque en España los datos de prevalencia en carne de porcino son bajos, tanto para ECVT en general como para O157 en particular (1,3% y 0,2%, respectivamente), son más elevados que los de la media europea (0,3% y 0,04%, respectivamente) (Tabla 27) (EFSA/ECDC, 2012).

Tabla 27. Prevalencia de ECVT en carne de cerdo en España (2007-2010) (EFSA/ECDC, 2012)

Año	Nº	ECVT	ECVT O157
2007	55	0 (0%)	0 (0%)
2008	247	5 (2,0%)	0 (0%)
2009	85	1 (1,2%)	1 (1,2%)
2010	160	1 (0,6%)	0 (0%)
TOTAL	547	7 (1,3%)	1 (0,2%)

En EE.UU. existen pocos datos de organismos oficiales de seguridad alimentaria sobre la prevalencia de ECVT en carne de porcino. En un estudio realizado en la ciudad de Washington entre los años 2009 y 2010, en el que se analizaron 231 muestras de carne picada de cerdo procedentes de diferentes puntos de venta al consumidor, se detectaron cepas de ECVT en 12 (5,2%) de las muestras analizadas (Ju *et al.* 2012).

Los diferentes estudios a nivel mundial indican, por tanto, que hay que considerar la carne de origen porcino como fuente potencial de infecciones por ECVT. De hecho, carne de cerdo asada, fue la causante de un brote provocado por ECVT O157 en la ciudad de Ontario, Canadá (Trotz-Williams, 2012).

1.4.4.3. ECVT en carne de ave

Al contrario que en los diagramas de flujo de las operaciones en mataderos bovinos y porcinos, el del matadero avícola presenta unas diferencias significativas en cuanto a puntos críticos de control a nivel microbiológico (Figura 17) (CAR/PL, 2006):

- Tanto en el transporte al matadero, como en la espera y recepción en el mismo, las instalaciones deben estar bien ventiladas, ya que el riesgo de que se produzcan heridas y se puedan contaminar las aves entre ellas es muy alto. Posteriormente, es fundamental que las jaulas sean retiradas y transportadas a una zona de lavado y desinfección.

- La fase de escaldado supone en este caso, el punto más crítico a nivel microbiológico, esta operación se realiza para debilitar la inserción de la pluma en los folículos y facilitar la posterior operación de desplumado. Se realiza normalmente sumergiendo las aves en

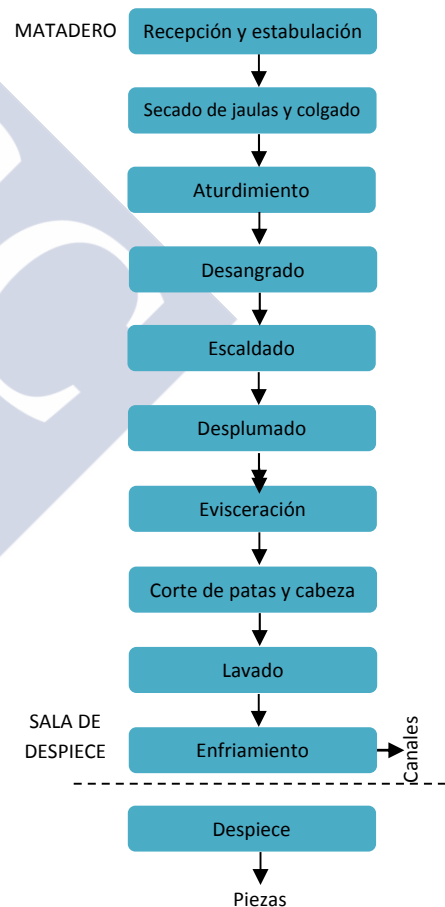


Figura 17. Diagrama de flujo del proceso productivo de la carne de origen aviar (CAR/PL, 2006)

un baño de agua caliente a 49 °C-52 °C durante 2-3 min. La agitación del agua del escaldador facilita la penetración del agua caliente entre las plumas y su llegada a la piel. Debido a que la temperatura alcanzada por el escaldador no es suficiente para eliminar los microorganismos se podría producir la contaminación del agua del escaldador, convirtiéndola en un caldo de cultivo y provocando la contaminación en masa de las canales.

- El desplumado es también, desde el punto de vista higiénico, otra fase crítica, ya que al realizarse en un ambiente húmedo y cálido, se favorece el crecimiento microbiano. Este aspecto se ve amplificado por la posibilidad de que los dedos de goma de las máquinas de desplume propaguen la contaminación de un animal a otro. Por este motivo, es necesario realizar una ducha abundante una vez acabada la operación.
- La evisceración también supone un punto crítico a nivel microbiológico, debe realizarse a temperatura controlada, se retira al menos el intestino completo teniendo cuidado de que no se contamine el interior de la canal con material fecal. Los despojos no comestibles, desechos y plumas son retirados lo antes posible para evitar contaminaciones.
- Debido al elevado número de procesos críticos desde el punto de vista microbiológico anteriores a este punto, el lavado de las canales después de la evisceración es obligatorio. Su finalidad es la de limpiar las canales de restos de vísceras, esquilas de hueso y restos de sangre, así como de eliminar, en parte, la contaminación microbiana superficial. Sin embargo, se suele hacer con agua a presión, por lo que el riesgo a utilizar agua contaminada o a un exceso de humedad superficial en las canales sigue estando presente.
- Finalmente, es fundamental un enfriamiento rápido con el objetivo de frenar o inhibir el crecimiento de los microorganismos presentes en la canal. La temperatura de la canal a la salida de la cámara de reposo ha de ser inferior o igual a 4 °C.

Según su destino, las canales se conservan en cámaras de refrigeración o de congelación. En este punto, al igual que con el ganado vacuno y porcino, éstas pueden ser envasadas (plastificadas, al vacío o en atmósfera modificada) y destinadas a

expedición y al mercado de consumo o enviadas a salas de despiece y fabricación de elaborados, donde los riesgos microbiológicos son los mismos para los 3 tipos de carne.

A pesar de la gran cantidad de puntos críticos que se observan en el procesado de este tipo de carnes, la detección de ECVT en carne de origen aviar no es muy frecuente, debido a que las aves no se consideran reservorio natural de este tipo de cepas, por lo que lo más común es pensar que los ECVT llegan a este tipo de carnes por contaminación cruzada. No obstante, existen algunos estudios donde sí se detectan, aunque la prevalencia suele ser muy baja.

Entre los años 2007 y 2010, 7 países miembros de la UE reportaron datos de prevalencia de ECVT en carne de pollos de engorde, con niveles entre 0,1% (Bulgaria) y 14,1% (Bélgica). En total, de todos los países que realizaron el estudio, solo España reportó una cepa ECVT O157. Globalmente, la prevalencia de ECVT en carne de pollo, fue del 2,8% para ECVT y del 0,02% para ECVT O157 (Tabla 28) (EFSA/ECDC, 2012).

Tabla 28. Prevalencia de ECVT en carne de pollo en la UE (2007-2010) (EFSA/ECDC, 2012)

Año	Nº	ECVT	ECVT-O157
2007	1.187	1 (0,1%)	0 (0%)
2008	566	0 (0%)	0 (0%)
2009	1.602	141 (8,8%)	0 (0%)
2010	1.989	8 (0,4%)	1 (0,1%)
TOTAL	5.344	150 (2,8%)	1 (0,02%)

En el año 2009, Polonia investigó la presencia de ECVT en 200 muestras de carne de pavo, resultado todas negativas para VT. Paralelamente, durante el periodo 2009-2010, Alemania realizó un estudio para analizar la presencia de ECVT en carne de pavo, reportando una prevalencia del 5,4% de las 37 muestras analizadas en 2009 y ninguna positiva de las 26 muestras analizadas en el año 2010 (EFSA/ECDC, 2012). En 2011, Luxemburgo realizó otro estudio en el que analizó la presencia de ECVT en 30 muestras de carne de pavo de importación, ninguna resultó positiva para ECVT (EFSA/ECDC, 2013).

Analizando los datos aportados por España a la EFSA, nos encontramos con niveles mucho más elevados que la media europea. Por un lado, en el año 2010 España informó sobre el análisis de 74 muestras de carne de pollo de engorde, en las cuales se detectó la

presencia de ECVT en 8 (10,8%), y de ECVT O157 en 1 (1,4%), y en el año 2011, del análisis de 34 muestras de carne fresca de aves de corral, España informó de 1 caso positivo (2,9%) para ECVT O157 (EFSA/ECDC, 2012).

En EE.UU., se ha evaluado ocasionalmente la existencia de ECVT en aves de corral. Magwedere y colaboradores (2013), realizaron un estudio en el que se analizaron 16 muestras de carne picada de pollo mediante PCR para la presencia de los 7 principales serogrupos de ECVT implicados en infecciones de seres humanos, y aunque detectaron *E. coli* de los serogrupos O45, O103 y O157 en el 75% de las muestras, ninguna cepa resultó ser positiva para VT.

En cuanto al resto de países, no hay muchos estudios de prevalencia de ECVT en carne de origen aviar. En China, Wang y colaboradores (2014) aislaron ECVT O157 en 1 de las 60 (1,67%) muestras de carne de pollo y en ninguna de las 20 de carne de pato. También en China, Bai *et al.* (2015) analizaron 205 muestras de carne de pollo y 13 de pato, en ambos tipos se aislaron ECVT de 1 muestra (0,5% y 7,7%, respectivamente). En Corea, Lee y colaboradores (2009) analizaron 900 muestras de carne de pollo y aislaron 3 cepas positivas para ECVT (0,3%).

1.4.5. ECVT en productos agrícolas

Vegetales y frutas son, generalmente, colonizados por una gran variedad de microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos que pueden provocar su deterioro (Lindow y Brandl, 2003; Abadias *et al.* 2008). La contaminación de las lechugas se produce principalmente por bacterias gram negativas, en particular, miembros de las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae* (Oliveira *et al.* 2010). Además, está bien establecido que algunos productos pueden contener también patógenos potenciales (Nguyen-the y Carlin, 1994; Beuchat, 1996; Francis *et al.* 1999) y que muchos de estos han sido implicados en un creciente número de brotes de origen alimentario (Long *et al.* 2002).

El aumento del número de infecciones alimentarias asociadas al consumo de productos agrícolas que se ha producido en los últimos años, viene determinado por aumento de la demanda de este tipo de productos. Por un lado, debido a una mayor concienciación

social sobre el beneficio que supone su consumo para la salud, y por otro lado, por el incremento de la oferta de productos agrícolas listos para comer (ready-to-eat). En todo caso, el aumento de la elaboración y manipulación de los productos vegetales supone un mayor riesgo de contaminación cruzada. Por todo esto, el Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health (SCVPH) emitió un informe sobre *E. coli* verotoxigénicos e identificó, entre otros, a los vegetales frescos (en particular los brotes de semillas) y zumos de frutas sin pasteurizar, como objeto de vigilancia en relación con la salud pública (SCVPH, 2003). Este grupo de alimentos también se ha considerado (en los informes de la EFSA sobre ECVT) como una fuente importante de transmisión de ECVT (EFSA, 2007, 2011a).

En el caso concreto de los brotes, las condiciones de producción (humedad y temperatura), favorecen el crecimiento de los microorganismos contaminantes (Mora *et al.* 2011b; Blanco, 2012). La contaminación de verduras y hortalizas puede ocurrir a nivel superficial o en los tejidos internos. Aunque la contaminación de ECVT intratisular se ha visto fundamentalmente en las hojas de las verduras, también se han descrito casos de internalización de ECVT O157 en tomates (Ibarra-Sánchez *et al.* 2004). La presencia de ECVT viable se ha encontrado en tejidos internos de brotes de rábano y estomas procedentes de semillas experimentalmente contaminadas con la bacteria (Itoh *et al.* 1998).

La contaminación de frutas y hortalizas, al igual que los productos cárnicos, puede producirse en los diferentes eslabones de la cadena alimentaria (Beuchat y Ryu, 1997; FAO/OMS, 2008):

- Durante la producción primaria (incluida la recolección).
- Durante la post-recolección (incluido el manejo, transporte y procesado).
- En la comercialización en tiendas y supermercados.
- En los establecimientos de elaboración de comidas preparadas y después de la venta, (transporte y a nivel doméstico) por una mala manipulación por parte del consumidor.

Las principales fuentes de contaminación fecal de los productos agrícolas son: el agua de irrigación contaminada con residuos procedentes de granjas de animales o con aguas residuales humanas, la aplicación de fertilizantes orgánicos de origen animal y el contacto directo de animales (salvajes o domésticos) con el producto vegetal fresco cuando está creciendo en el campo (Oliveira *et al.* 2012). En el proceso de comercialización y de preparación culinaria, las fuentes de contaminación se relacionan con el uso de agua de lavado contaminada, útiles no desinfectados y deficientes prácticas de manejo de frutas y hortalizas (Södertrom *et al.* 2005; Tyrrel *et al.* 2006; Gelting *et al.* 2011).

En la literatura científica se pueden encontrar numerosos estudios que describen brotes de infección por ECVT asociados con frutas y hortalizas, particularmente con semillas y brotes, y ensaladas de vegetales (Como-Sabetti *et al.* 1997; Ackers *et al.* 1998; Hilborn *et al.* 1999; Michino *et al.* 1999; Breuer *et al.* 2001; Mohle-Boetani *et al.* 2001; Ferguson *et al.* 2005; Söderstrom *et al.* 2005; CDC, 2006; Blanco, 2012; Friesema *et al.* 2008; Wendel *et al.* 2009; Herman *et al.* 2015). Curiosamente, los dos brotes más importantes tanto por su gravedad como por número de afectados, que se han producido por ECVT a lo largo de la historia están asociados a brotes o semillas. Por un lado, el brote más grande en número de casos de diarrea y CH fue producido por una cepa ECVT O157 en el año 1996 en la ciudad de Sakai (Osaka, Japón) y se asoció con el consumo de brotes de rábano (Michino *et al.* 1999). Por otro lado, el brote más importante que ha ocurrido por número de casos de SUH, fue el producido en Alemania y Francia por la cepa O104:H4 asociado al consumo de semillas y brotes de fenogreco (Blanco, 2012). Sin embargo, a pesar del gran número de brotes descritos asociados al consumo de productos agrícolas, la prevalencia de ECVT en estos suele ser generalmente baja.

En Europa, durante los años 2004-2010, 14 estados miembros de la UE analizaron muestras de frutas, vegetales y otros productos de origen vegetal. Un total de 6.285 muestras fueron analizadas y tan solo 18 fueron positivas para ECVT (0,3%) y 10 de esas muestras fueron identificadas como ECVT O157 (0,2%). Prácticamente todos los positivos registrados fueron en vegetales, donde el 0,7% de las muestras analizadas dieron positivo para ECVT (Tabla 29) (EFSA, 2011a, EFSA/ECDC, 2012).

Tabla 29. Detección de ECVT en frutas, vegetales y otros productos de origen vegetal, reportados por estados miembros de la UE (2004-2010) (EFSA, 2011b; EFSA/ECDC, 2012)

Producto agrícola	N°	ECVT	O157
Frutas y hortalizas	691	1 (0,1%)	0 (0%)
Vegetales	2.394	17 (0,7%)	10 (0,4%)
Frutas y hortalizas	2.774	0 (0%)	0 (0%)
Zumos	317	0 (0%)	0 (0%)
Brotes	104	0 (0%)	0 (0%)
Espicias y hierbas	3	0 (0%)	0 (0%)
Ensaladas listas para el consumo	2	0 (0%)	0 (0%)
TOTAL	6.285	18 (0,3%)	10 (0,2%)

En España, en el año 2008, el LREC analizó la presencia de ECVT en 100 lechugas de varios establecimientos comerciales de la ciudad de Lugo. Se determinó una aceptable calidad higiénico sanitaria, ya que el 99% de las lechugas tenían <10 ufc de *E. coli* por gramo. Además, en ninguna de ellas se detectó la presencia de ECVT ni de otro tipo de *E. coli* diarreagénico (Mora *et al.* 2011b).

1.4.6. ECVT productos lácteos

La leche y los productos lácteos albergan una gran variedad de microorganismos y pueden ser fuente importante de patógenos causantes de enfermedades alimentarias. La presencia de ECVT en leche se produce, principalmente, durante las operaciones de ordeño, ya sea por contacto directo con las heces de los rumiantes diseminadas en el ambiente de las granjas, o por la excreción de microorganismos a través de las ubres de animales enfermos (Oliver *et al.* 2005). Por lo tanto, evitar la contaminación durante el proceso de ordeño es fundamental para el control de este patógeno en granja.

La infección de las ubres, si se trata de mamitis clínicas, puede detectarse fácilmente, pero si se trata de mamitis subclínicas, que no producen síntomas, pueden no detectarse y pasar las cepas patógenas directamente a la leche (Otero, 2014). Por otro lado, puede producirse contaminación durante el ordeño si la limpieza previa de la superficie de las ubres no es correcta o por restos de heces que porten los animales en piel y pelos.

La implantación de procesos de limpieza efectivos tanto de los animales, como de las máquinas de ordeño y transporte es muy importante, ya que la contaminación de la maquinaria puede provocar la propagación de los ECVT a los tanques de

almacenamiento (Catford *et al.* 2014). Además, la entrada de patógenos causantes de infecciones alimentarias en las plantas de procesamiento de productos lácteos a través de leche contaminada, puede provocar su persistencia mediante la formación de biofilms, con la consiguiente contaminación de los productos lácteos procesados y la exposición al consumidor de las bacterias patógenas (Oliver *et al.* 2005).

Normalmente, los tratamientos térmicos a los que se somete a la leche son efectivos para los ECVT, por lo que la prevalencia de éstos es generalmente baja. Sin embargo, algunos estudios han detectado la presencia de ECVT en leche y productos derivados pasteurizados, e incluso, se han producido algunos grandes brotes asociados a este tipo de productos. Como por ejemplo, un brote provocado por queso pasteurizado que afectó a 114 personas en el Reino Unido en 1999 (Goh *et al.* 2002), otro por leche pasteurizada con más de 100 afectados en Escocia en 1994 (Upton y Coia, 1994) y más recientemente, otro brote provocado por queso pasteurizado en EE.UU., con 135 afectados (CDC, 2013a). Esto se debe fundamentalmente a tratamientos térmicos deficientes o a contaminaciones post-pasteurización.

Especialmente problemático es el caso de los productos elaborados con leche cruda, ya que los microorganismos presentes en la leche (patógenos o no) se mantienen inalterados y pasan al producto, lo cual exige un control exhaustivo del proceso de elaboración, como es el caso de quesos elaborados con leche cruda de vaca, oveja o cabra, que resultan vehículos potenciales de infecciones por ECVT implicados en brotes (Espíe *et al.* 2006; Catford *et al.* 2014).

En un estudio elaborado en EE.UU., evaluaron 121 brotes provocados por productos lácteos (pasteurizados y sin pasteurizar) durante el periodo 1993-2006, y encontraron que los productos pasteurizados habían provocado en ese periodo 48 brotes (40%), de ellos, ninguno asociado a ECVT. Por el contrario, encontraron 73 brotes (60%) provocados por leche sin pasteurizar o derivados, y de éstos, 10 habían sido provocados por ECVT (13,7%) (Langer *et al.* 2012).

Además, está demostrado que cepas de *E. coli* patógenas son capaces de sobrevivir en condiciones de baja acidez como en fermentaciones lácticas producidas durante la

elaboración de yogures o quesos. Cirone y colaboradores (2013) demostraron que los ECVT O157 eran capaces de sobrevivir a las condiciones de fermentación del yogur y a los bajos niveles de pH asociados a ésta, seguidos de refrigeración durante, al menos, 20 días. Esto pone en evidencia la importancia de implementar buenas prácticas de producción durante la elaboración y refrigeración de este tipo de productos (Cirone *et al.* 2013, Hickey *et al.* 2015).

Por todo esto, queda claro que la prevalencia de ECVT en productos lácteos depende, en gran medida, de la ausencia o deficiencia del tratamiento térmico, así como de las contaminaciones ocurridas posteriormente a éste.

Farrokh y colaboradores (2013) realizaron una amplia revisión sobre la prevalencia e impacto de los ECVT en la producción de leche y derivados. Y observaron en lo que respecta a leche cruda, que la prevalencia de ECVT no ha variado significativamente en los últimos 10 años (Farrokh *et al.* 2013).

Los datos analizados sugieren variaciones geográficas en cuanto a la prevalencia de ECVT en leche de vaca cruda, oscilando entre el 2,4%-15,2% en EE.UU., 0%-12% en América Latina y 0%-36% en Europa. Sin embargo, para hacernos una idea de esta variación, dentro del continente europeo, cuya prevalencia media entre los años 2007-2010 fue del 1,9% (Tabla 30) (EFSA/ECDC, 2012), encontramos países con tasas de prevalencia de ECVT del 0% en Holanda y 1,5% en Alemania; y por el contrario, países con una prevalencia del 36% en Irlanda, y 21% en Francia (Farrokh *et al.* 2013).

Tabla 30. ECVT en leche cruda de vaca en la UE (2007-2010) (EFSA/ECDC, 2012)

Año	Nº	ECVT	ECVT-O157
2007	1.079	5 (0,5%)	0 (0%)
2008	1.439	24 (1,7%)	1 (0,7%)
2009	998	12 (1,2%)	1 (0,1%)
2010	1.683	56 (3,3%)	0 (0%)
TOTAL	5.199	97 (1,9%)	2 (0,04%)

En lo que respecta a leche cruda de otros orígenes, Farrokh y colaboradores observaron una prevalencias de ECVT O157 en leche cruda de cabra: 0,75% en EE.UU.; 1,7% en Italia; 0,7% en Grecia y 16,3% en Suiza para ECVT en general. Para ECVT O157 en leche cruda de oveja: 0% en EE.UU.; 0,8%-13,8% en Grecia y 12,7% en Suiza para ECVT

general. En leche cruda de búfala: 0,6% en Italia para ECVT general (Farrokh *et al.* 2013).

En lo que respecta a la prevalencia de ECVT en quesos, Farrokh y colaboradores encontraron que la prevalencia de ECVT en quesos a base de leche de vaca cruda en la UE oscila entre 0,2% y 2,4%, observándose las mismas variaciones entre países (p.e. 0,48% en Alemania y 11,7% en Francia) (Farrokh *et al.* 2013). También se observó la prevalencia de ECVT O157 en quesos producidos a base de leche cruda de otros orígenes: 0% de cabra y oveja en Bélgica, Italia, Portugal y España; 0% de búfala en Italia. De Reu y colaboradores (2004) reportaron también la prevalencia de otros derivados lácteos como helados, yogures y mantequilla en Bélgica (0% en todos los casos).

Por otro lado, durante el periodo 2007-2010, países miembros de la UE reportaron la detección de ECVT en leche y quesos de cabra y oveja, y en otros derivados lácteos. En general, se analizaron 11.733 muestras en ese periodo y tan solo 64 (0,5%) fueron positivas para ECVT, de las cuales 2 resultaron ser ECVT O157 (0,02%). De estos resultados, hay que destacar que no se detectó ECVT en ninguna de las muestras de leche de oveja o cabra analizadas (4.066 muestras) (EFSA/ECDC, 2012).

1.5. Otros *E. coli* diarreagénicos en alimentos

Al contrario de lo que sucede con las patologías derivadas a ECVT, asociadas principalmente a países desarrollados, y cuyas fuentes de transmisión incluyen, fundamentalmente, productos animales u hortícolas manipulados de manera inadecuada, las infecciones por otros grupos de *E. coli* diarreagénicos (principalmente ECEP, ECET y ECEA) se describen principalmente en países en vías de desarrollo asociadas con cuadros de diarrea infantil, en individuos inmunodeprimidos o con cuadros de diarrea del viajero (Adachi *et al.* 2001; Samie *et al.* 2007; Okeke, 2009); si bien es cierto que las prevalencias comunicadas de estos patógenos varían enormemente entre distintos países, y todavía existe un gran desconocimiento de otros datos epidemiológicos (fuentes, reservorios, rutas, estacionalidad) (Nguyen *et al.* 2005; Okeke, 2009; Vilchez *et al.* 2009).

Los ECET y ECEA son, con gran diferencia, los principales agentes causales de la diarrea del viajero (Sharp *et al.* 1995; Schultsz *et al.* 2000; Adachi *et al.* 2001, 2002; Qadri *et al.*

2005; Paredes-Paredes *et al.* 2011). Se asume que estos dos grupos de *E. coli* diarreagénicos se transmiten principalmente a través de alimentos de diferentes tipos (ensaladas listas para consumo, postres, salsas de guarnición) y agua de bebida contaminada (Wood *et al.* 1983; Adachi *et al.* 2002; Okeke, 2009; Castro-Rosas *et al.* 2012). El agua de riego no controlada sanitariamente, aparece implicada como fuente de contaminación primaria en varios estudios epidemiológicos (Simiyu *et al.* 1998; Okeke, 2009; Castro-Rosas *et al.* 2012).

1.6. El papel de los alimentos en la transmisión de *E. coli* patógenos extraintestinales

Las infecciones transmitidas por alimentos estaban limitadas tradicionalmente a aquellas que afectaban al tracto gastrointestinal, pero el hecho de que un número creciente de estudios vincule las infecciones del tracto urinario (ITU) con la transmisión de *E. coli* en alimentos, ha generado el debate de si el grupo de los ExPEC debería clasificarse realmente como patógenos transmitidos por los alimentos, y ha dado lugar a un nuevo término: foodborne UTI o FUTI (infecciones del tracto urinario transmitidas por alimentos) (Nordstrom *et al.* 2013; Markland *et al.* 2015).

Históricamente, las ITU se consideraban infecciones esporádicas, pero actualmente se sabe que también se producen en forma de brote (George y Manges, 2010). Al principio, los brotes se detectaban en base a sus perfiles de resistencia, pero con el desarrollo de los análisis moleculares se estableció la clonalidad de las cepas implicadas (Blanco M. *et al.* 2009; Mora *et al.* 2011a). Y aunque las fuentes de los brotes de ITU, así como la incidencia real de estos procesos, todavía es bastante desconocida, las similitudes moleculares y fenotípicas de las cepas de *E. coli* implicadas contradicen las tesis de la selección *de novo*, relacionada con la presión antibiótica o el origen hospitalario (Oteo *et al.* 2006; Mendonca *et al.* 2007), sugiriendo en su lugar fuentes específicas como los alimentos contaminados (Manges *et al.* 2001, 2008; Pitout *et al.* 2005; Markland *et al.* 2015).

Muchos estudios aportan evidencias que apoyan la hipótesis de los alimentos como transmisores de *E. coli* implicados en ITU. Vincent y colaboradores (2010) compararon

cepas aisladas de mujeres con ITU con cepas de alimentos cárnicos y otros listos para su consumo, obtenidos en el mismo periodo y área geográfica. Encontraron que cepas aisladas de carne de pollo y una cepa de melón eran genotípicamente similares a ciertas cepas causantes de infección en humanos. Otro estudio llevado a cabo en 2006, sobre diferentes productos cárnicos obtenidos en distintas ciudades de EE.UU., encontró que las cepas con la categoría de ExPEC (Johnson *et al.* 2003a), incluidas multirresistentes, representaban más del 20% de las cepas de *E. coli* aisladas carne de pollo y pavo, el 8,3% de las de carne de cerdo y el 3,4% de las de carne picada de vacuno (Xia *et al.* 2011a).

Todos los estudios revisados sobre presencia de *E. coli* del patotipo ExPEC y/o portadores de resistencias apuntan a los productos cárnicos, y especialmente a la carne de ave, como fuente evidente de exposición para los humanos de este tipo de cepas.

Entre los estudios más extensos, en cuanto a número y variedad de alimentos, destaca el de Johnson y colaboradores (2005) que analizaron 1.648 muestras de alimentos (carne de vacuno, cerdo y aves, y productos no cárnicos) obtenidos de 10 establecimientos durante 2001-2003, de las que aislaron *E. coli* en 396 (9% de productos no cárnicos; 69% de carne de vacuno y cerdo; 92% de carne de ave). Al analizar el perfil de resistencias de las cepas de *E. coli* aisladas, encontraron una clara asociación de las resistencias a ciprofloxacina con la carne de ave (3,4% vs. 0,5% de las cepas aisladas del resto de alimentos) y al ácido nalidíxico (30% de las de carne de ave frente al 3% de carne de vacuno y cerdo; y 2,5% de productos no cárnicos). Además, el 46% de las cepas de *E. coli* aisladas de carne de ave tenían categoría ExPEC, frente al 19% de carne de cerdo y vacuno, y el 4% de otros productos.

Algunos autores, no solo han demostrado que las cepas de *E. coli* transmitidas por alimentos están genéticamente relacionadas con cepas causantes de ITU en humanos, sino que también reproducen dicha infección *in vivo* en un modelo murino urinario, reforzando la hipótesis de las ITU como zoonosis (Jakobsen *et al.* 2010, 2012). Específicamente, Jakobsen y colaboradores (2012) ensayaron 9 cepas del filogrupo B2 con categoría ExPEC aisladas de carne de ave y cerdo. Todas ellas resultaron virulentas en un modelo murino con cultivos positivos en orina, vejiga y riñón.

Se asume que el grupo clonal ST131 no solo circula entre los humanos sino que también lo hace en diferentes hospedadores animales (Johnson *et al.* 2009b; Ewers *et al.* 2010; Guenther *et al.* 2011), lo que contribuiría al mantenimiento y diseminación del mismo, en caso de que exista una circulación regular entre el hombre y los animales. El éxito del grupo clonal ST131 está claramente vinculado a la diseminación y mayor prevalencia de CTX-M-15, aunque recientemente se han reportado cepas ST131 ligadas a otros tipos de CTX-M (Dahbi *et al.* 2014).

No hay muchos trabajos que describan la presencia del ST131 en alimentos y su papel en la transmisión al hombre. Destaca la detección, por primera vez, en una granja de producción avícola de 1 cepa del grupo clonal ST131 productora de CTX-M-9 que mostraba un perfil molecular similar al de cepas de origen humano (Cortés *et al.* 2010). Concretamente en alimentos, Vincent y colaboradores (2010) detectaron 1 cepa del grupo clonal ST131 aislada en Montreal en el año 2006 de carne de pollo, con un perfil de macrorrestricción indistinguible con respecto a 2 cepas de ITU humanas. En otro estudio, Mora y colaboradores (2010) concluyeron la reciente emergencia de cepas del grupo clonal O25b:H4-ST131 *ibeA KpsM II-K1* productoras de CTX-M-9 y demostraron la similitud (>90%) de los perfiles de macrorrestricción entre cepas aisladas de carne de pollo (5 cepas), de patología aviar (2 cepas) y 3 cepas aisladas de pacientes humanos. Kawamura y colaboradores (2014), en un estudio orientado a la detección de *E. coli* BLEE en alimentos, detectaron que 4 muestras de carne de pollo eran portadoras de cepas O25b:H4-ST131 productoras de CTX-M-2 (2 cepas), CTX-M-8 y SHV-12. En 2014, Zurfluh y colaboradores (2015), en un estudio orientado a la detección de BLEE en vegetales de importación en Suiza, no solo encontraron 1 cepa del grupo clonal O25b:H4-ST131 productora de CTX-M-15 en un pepino importado de la República Dominicana, sino que además, encontraron una prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en vegetales importados de República Dominicana, India, Tailandia y Vietnam sorprendentemente elevada (13,01%).

No existen en la literatura científica muchos trabajos que investiguen la presencia de *E. coli* productores de BLEE en alimentos, los más destacados se citan en la Tabla 31.

Tabla 31. Revisión de prevalencia y tipos de BLEE detectados en alimentos

Año	País de origen	Alimento	Prevalencia de BLEE	BLEE	Referencia
2003	España	Comida preparada de hospital	0,2%	CTX-M-14	Lavilla <i>et al.</i> 2008
2004-2006		Carne de pollo	57,4%	CTX-M-14, CTX-M-9, SHV-12, CTX-M-1, CTX-M-32, SHV-2	
		Carne de conejo	58%	CTX-M-14, SHV-12, CTX-M-9	
		Carne de cordero	5%	CTX-M-14	
2006	UK	Carne de pollo	1,6%	CTX-M-1	Warren <i>et al.</i> 2008
	De importación (Irlanda, Brasil, Polonia, Francia, Holanda, España, Dinamarca, Alemania)	Carne de pollo	33,3%	CTX-M-2	
	Origen desconocido	Carne de pollo	17,5%	CTX-M-14, CTX-M-8, CTX-M-2	
2006-2007	EE.UU. (Pittsburg)	Carne de pollo	5%	CTX-M (grupo 1)	Doi <i>et al.</i> 2010; Egea <i>et al.</i> 2012
	España (Sevilla)	Carne de pollo	67%	CTX-M-14, CTX-M-32, CTX-M-1, CTX-M-15, SHV-12	
		Carne de pavo	58%		
		Carne de cerdo	25%		
		Carne de vacuno	9%		
2008	UK (importada de Argentina, Chile y Brasil)	Carne de pollo	29,5%	CTX-M (grupo 8 y grupo 2)	Dhanji <i>et al.</i> 2010
2008	España (Sevilla)	Ensalada fresca	3,1%	SHV-12	Egea <i>et al.</i> 2011
2009	Holanda	Carne de pollo	76,8%	CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-2, TEM-52, SHV-12, SHV-2	Overdevest <i>et al.</i> 2011
		Carne de vacuno	4,7%		
		Carne de cerdo	1,8%		
		Carne picada (Mezcla)	9,1%		
		Otros tipos de carne	11,1%		
2010	España (Sevilla)	Carne de pollo	93,3%	CTX-M-14, CTX-M-9, CTX-M-32, CTX-M-1, SHV-12	Egea <i>et al.</i> 2012
		Carne de pavo	93,3%		
2010	Japón	Carne de pollo	22,9%	CTX-M-15, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-1, CTX-M-3, SHV-12, SHV-2, TEM-52	Kawamura <i>et al.</i> 2014
2010	Holanda	Carne de pollo	94%	CTX-M-1, CTX-M-2, SHV-12, SHV-2, TEM-52, TEM-20	Leverstein-van Hall <i>et al.</i> 2011
2009-2011	Dinamarca	Carne de pollo	17,8%	CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-14, SHV-12, SHV-2, TEM-52, TEM-20	Carmo <i>et al.</i> 2014
		Carne de cerdo	1,2%		
		Carne vacuno	0,5%		
	De importación	Carne de pollo	44,7%		
		Carne de cerdo	2,4%		
		Carne vacuno	1,1%		
2011	Suiza	Leche (de mastitis)	1,5%	CTX-M-14/TEM-1	Geser <i>et al.</i> 2012
2012-2013	Túnez	Vegetales (tiendas)	4,1%	CTX-M-1	Said <i>et al.</i> 2015
		Cereales (granja)	4,4%	CTX-M-1, CTX-M-14	
2014	Suiza (importados de República Dominicana, India y Tailandia)	Vegetales	13%	CTX-M-15, CTX-M-55, CTX-M-14, CTX-M-65, CTx-M-1, SHV-12	Zurfluh <i>et al.</i> 2015

Un factor común entre casi todos los estudios citados, es que el origen de la mayoría de los aislamientos de cepas de *E. coli* productoras de BLEE es la carne de origen aviar. Además, se observa un predominio de las BLEE CTX-M de los grupos 1 y 9 en España (CTX-M-1 y CTX-M-14, principalmente), mientras que en el resto de países se detectan con frecuencia, además de los grupos 1 y 9, los grupos 2 y 8 (CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-2 y CTX-M-8, principalmente). Cabe destacar, que en muy pocos estudios se detectó la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE del tipo CTX-M-15 asociadas al grupo clonal ST131. Por otro lado, la mayoría de los estudios coinciden en la alta prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE del tipo SHV-12 (Lavilla *et al.* 2008; Warren *et al.* 2008; Doi *et al.* 2010; Dhanji *et al.* 2010; Leverstein-van Hall *et al.* 2011; Egea *et al.* 2011, 2012; Geser *et al.* 2012; Kluytmans *et al.* 2013; Ojer-Usoz *et al.* 2013; Carmo *et al.* 2014, Kawamura *et al.* 2014; Zurfluh *et al.* 2015).

1.7. Control de contaminación microbiológica en alimentos

La prevención y control de la contaminación microbiológica en alimentos requiere un enfoque multi e interdisciplinario que englobe toda la cadena de producción y abastecimiento de alimentos (desde el campo/granja a la mesa) y que garantice que dicho control no se rompa en ningún punto de la cadena alimentaria, tal y como establece el Reglamento (CE) Nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la higiene de los productos alimenticios (FAO, 2012).

Las investigaciones sobre la prevención de la contaminación de los alimentos y el agua por ECVT y las estrategias para eliminar o limitar radicalmente el crecimiento de cualquier ECVT que pueda estar presente en los alimentos se han centrado, principalmente, en el ECVT O157. No obstante, también se han llevado a cabo estudios para las cepas de ECVT no O157 (AESAN, 2012).

Actualmente, se encuentran en desarrollo y evaluación varios tipos de intervenciones pre-sacrificio de los animales, mientras que se han validado e incorporado numerosas intervenciones post-sacrificio que tienen como objetivo descontaminar la canal después de la carnización de los animales (AESAN, 2012). Por otro lado, las tecnologías actuales o prácticas aplicadas durante el procesado post-cosecha no eliminan eficazmente los

microorganismos que contaminan frutas y hortalizas, por lo que los esfuerzos se deben dirigir, fundamentalmente, a la prevención de la contaminación, tanto en pre-cosecha como en post-cosecha (OMS, 2008).

- Las buenas prácticas agrícolas (BPA), de higiene (BPH), de fabricación (BPF) y Análisis de Peligros y de Puntos de Control Críticos (APPCC) son las primeras medidas a tener en cuenta en el control de ECVT y otros microorganismos patógenos, tanto en alimentos de origen animal como vegetal. Estos manuales de buenas prácticas describen las medidas preventivas relativas a las operaciones agrícolas, de fabricación y de higiene, con el objeto de reducir la contaminación del producto y proporcionar orientación sobre las prácticas agrícolas y de fabricación necesarias, encaminadas a conseguir aumentar la inocuidad alimentaria. La aplicación del sistema de análisis APPCC es una herramienta útil para prevenir la contaminación por ECVT, contribuyendo a disminuir su presencia a nivel de granja o campo de cultivo. La incorporación de programas APPCC en las plantas de procesado y embalaje es un requisito indispensable para conseguir la máxima inocuidad alimentaria.
- El tipo de alimentación de los animales de granja parece contribuir a la presencia de animales portadores de larga duración, por lo que es esencial considerar el desarrollo de alimentos que disminuyan la excreción de *E. coli* por parte de dichos animales, especialmente de aquellos destinados a la producción de carne y, por tanto, con destino al matadero (Berg *et al.* 2004, Wells *et al.* 2009). Alternativamente, con objeto de disminuir la presencia de dichos portadores en granja se está evaluando el uso de vacunas (Johnson *et al.* 2008; Smith, 2014; Cernicchiaro *et al.* 2014; Stanford *et al.* 2014a; Kerner *et al.* 2015), así como la posibilidad de alimentar al ganado con probióticos (DFM, direct-fed microbial) (Smith, 2014; Cernicchiaro *et al.* 2014; Stanford *et al.* 2014a, 2014b).
- Es imprescindible usar agua de buena calidad microbiológica para la bebida de los animales, tomar las medidas necesarias para su higienización y evitar la presencia de materia orgánica. Asimismo, se debe usar agua, para riego y la agricultura en general, de una calidad microbiológica adecuada (Buck *et al.* 2003; Semenov *et al.* 2009). A nivel de planta de procesado y envasado de vegetales frescos, se debe garantizar el control

microbiológico del agua utilizada para su lavado (Oliveira *et al.* 2012).

- Es necesario evitar el acceso de animales de granja (rumiantes en particular) en el entorno inmediato de los campos de cultivo. Asimismo, se debe controlar la contratación, manejo y tratamiento de estiércol y purines que se van a utilizar para fertilizar los campos destinados al cultivo de frutas y hortalizas para consumo humano (Semenov *et al.* 2010).
- El único método eficaz y permitido de eliminación de ECVT de los alimentos es la introducción de un tratamiento térmico (p.e. cocción o pasteurización), sin embargo, estas medidas solo son aplicables a productos elaborados y lácteos.
- Hasta el año 2013, solo estaba permitida la utilización de agua potable para eliminar la contaminación de superficie de los productos frescos de origen animal (Reglamento (CE) Nº 853/2004). Sin embargo, ese año, el Reglamento (UE) Nº 101/2013 de la Comisión autorizó la utilización del ácido láctico para reducir la contaminación microbiológica de superficie de canales, medias canales o cuartos de bovinos en matadero, siempre que las soluciones de ácido láctico cumplan las especificaciones establecidas en el Reglamento (UE) Nº 231/2012 (relativa a las especificaciones para los aditivos alimentarios), que se apliquen únicamente mediante pulverización o nebulización en concentraciones comprendidas entre el 2% y el 5% a temperaturas no superiores a 55 °C, y en condiciones controladas y comparables que se hallen dentro del sistema de gestión basado en los principios de APPCC. Está demostrado, que el uso de agua caliente, de vapor a presión y lavado con ácido láctico para descontaminar canales reduce de forma eficaz la contaminación por ECVT O157 (Koohmaraie *et al.* 2005; Bosilevac *et al.* 2006). Estas técnicas de intervención para eliminar la contaminación de la superficie de la carne también han demostrado su eficacia frente a otros ECVT no O157 como O26:H11 y O111:H8 (Cutter y Rivera-Betancourt, 2000).
- A pesar de que la legislación actual solo contempla la utilización de agua potable y ácido láctico para la descontaminación de las superficies de las canales, se han desarrollado y evaluado numerosas tecnologías para tal efecto, entre las que destacan: altas presiones hidrostáticas, ultrasonidos, irradiación, antimicrobianos naturales, campos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes, luz blanca de alta intensidad (Herrero y

Romero de Ávila, 2006; Aymerich *et al.* 2008). También se ha investigado la combinación de varias tecnologías de conservación no térmica y térmica bajo el nombre de tecnologías de barrera, con el fin de potenciar su eficacia (AESAN, 2012). A pesar de que la aplicación de estas tecnologías no está permitida por la ley, algunas resultan muy prometedoras, como es el caso de las altas presiones hidrostáticas y la luz ultravioleta, ya que tienen pocos inconvenientes para su aprobación por las autoridades sanitarias, por no necesitar etiquetado especial ya que no conllevan el uso de aditivos químicos y si se aplican adecuadamente no producen cambios en la textura, sabor y aroma del producto (Hayakawa *et al.* 1994; Alpas *et al.* 1999; Chun *et al.* 2010).

- En mataderos y salas de despiece, se debe garantizar una formación básica para los manipuladores de alimentos sobre las prácticas de higiene. Entre otros aspectos, debe asegurarse y controlarse con especial incidencia el uso de cuchillos en el proceso de evisceración y su desinfección en agua caliente a las combinaciones de temperatura y tiempo estipulados a tal efecto. Del mismo modo, en el proceso de evisceración deben controlarse de forma eficaz todas las maniobras que aseguren la no contaminación con materia fecal de canales y vísceras. Hay que garantizar el diseño adecuado y gestión de la higiene de los locales destinados al almacenamiento y procesado de alimentos, incluyendo los planes de control de plagas. Puesto que hay evidencias de portadores asintomáticos de ECVT (Stephan *et al.* 2000), el seguimiento y/o la exclusión de los portadores de ECVT relacionados con la manipulación de los alimentos se debe considerar como una opción de control.
- Una vez obtenido el producto final, el envasado se ha convertido en un punto de control de contaminación importante, hoy en día la utilización de envasado en atmósfera protectora (vacío, modificada o controlada) está ampliamente extendido, aunque ésta conlleva ciertos riesgos biológicos y su efecto sobre el crecimiento de algunas bacterias patógenas de transmisión alimentaria aún necesita ser evaluado AESAN, http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/otras_actividades/UIMP_seg_alimentaria_nutricion/Maria_Luisa_Garcia_Lopez.pdf). Por otro lado, la utilización de envases activos con antimicrobianos, parecen estar dando resultados prometedores. Otero y colaboradores (2014), evaluaron 2 films con actividad antimicrobiana contra ECVT O157 para queso de oveja y determinaron que la combinación de films de PET

(polietileno tereftalato) cubiertos con $\geq 6\%$ de LAE (etil lauroil arginato) como antimicrobiano, pueden ser útiles para reducir el número de cepas de ECVT O157 en queso de oveja. No obstante, muchos sistemas antimicrobianos que han demostrado fuerte actividad en modelos *in vitro*, no han mostrado una actividad similar en alimentos reales. Esto se debe, a que el resultado final depende de un gran número de factores intrínsecos, como la microbiota propia de cada alimento y las características de propio producto (PH, a_w , grasa, sal, etc.), así como a factores extrínsecos, como la temperatura de almacenamiento y la composición de la atmósfera (Otero *et al.* 2014).

- Es fundamental garantizar en todo momento la cadena de frío para todos los alimentos que así lo requieran.
- Es necesario informar a la población de los riesgos asociados a un manejo inadecuado de los alimentos. La carne, y en especial la carne picada, debe ser cocinada el tiempo suficiente para garantizar la inactivación bacteriana contaminante. Es importante evitar la contaminación cruzada de los alimentos que se van a comer crudos (frutas y verduras) con carne fresca no cocinada. Se debe realizar una distribución adecuada de los alimentos en el refrigerador doméstico a fin de evitar que los líquidos de los alimentos (carne y pescado) destinados a consumirse cocinados goteen sobre los alimentos que se consumen crudos o sin calentar (frutas y hortalizas). Se deben lavar cuidadosamente, en el entorno doméstico, las verduras que se comen crudas.
- Debido a la posible presencia de microorganismos patógenos, entre ellos ECVT, en la leche cruda, solo la leche sometida a un tratamiento térmico de pasteurización se puede considerar apta para el consumo.

1.8. Métodos de detección y caracterización de ECVT

1.8.1. Detección de ECVT

En los últimos años el desarrollo de métodos para la detección de ECVT se ha visto intensificado debido, fundamentalmente, a 3 factores:

Por un lado, y como hemos visto anteriormente, la ecología de los ECVT tiene como resultado que estos microorganismos sean encontrados en prácticamente todo tipo de

alimentos, animales y entornos, incluyendo áreas geográficas no asociadas a actividades agrarias (Beutin y Fach, 2014).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado que incluso empleando técnicas inmunológicas y genéticas muy sensibles, en la mayoría de las muestras, menos del 1% de los *E. coli* son ECVT, hecho que dificulta mucho su detección. Además, cabe destacar que en brotes graves causados por ECVT, los alimentos implicados pueden contener menos de 10 bacterias por gramo (Padhye y Doyle, 1992).

Por último, la gran diversidad de serotipos que presentan los ECVT, a pesar de tan solo un pequeño número de serotipos predominan en pacientes con patologías graves (O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O146 y O157) (Beutin *et al.* 2004; Brooks *et al.* 2005; Kappeli *et al.* 2011; ECDC/EFSA, 2011); con pocas excepciones, se han aislado cepas de ECVT de casi todos los serotipos conocidos. Además, se aíslan tanto de humanos, animales y alimentos muchas cepas de ECVT con antígeno O no tipable, lo que indica que la diversidad de serotipos de las cepas ECVT va más allá del actual esquema de serotipado (Scheutz y Strockbine, 2005; Bettelheim, 2007; Martin y Beutin, 2011; ECDC/EFSA, 2011).

Además, el brote del 2011 provocado por el ECVT-ECEA O104:H4 en Europa, puso en evidencia el riesgo de que otros serotipos de ECVT puedan emerger como patógenos importantes para los humanos en el futuro (Beutin y Fach, 2014).

Por todo esto, es necesario que las técnicas para la detección de ECVT sean capaces de adaptarse a cualquier tipo de matriz, que presenten una gran sensibilidad y que no se restrinjan a un número limitado de serotipos. Debido a la gran variedad de serotipos y fenotipos de ECVT, la identificación de las verotoxinas y de los genes subyacentes son la única vía para detectar todos los tipos de ECVT procedentes de cualquier tipo de muestra (Bettelheim y Beutin, 2003; Paton y Paton, 2003).

En las últimas 3 décadas se han desarrollado numerosas técnicas para la detección de verotoxinas que pueden agruparse en: pruebas fenotípicas (pruebas de citotoxicidad para VT y pruebas inmunológicas) y genotípicas (pruebas basadas en el ADN).

Las pruebas de citotoxicidad son adecuadas para demostrar la actividad biológica de las verotoxinas o la expresión de los genes *vt* (Beutin *et al.* 2007, 2008). Estudios comparativos han demostrado que son más sensibles para la detección de verotoxinas que las pruebas inmunológicas (Paton y Paton, 1998). Sin embargo, los límites de detección pueden ser críticos si las muestras contienen bajas cantidades de toxina o si la prueba falla en la detección de ciertos subtipos de VT1 o VT2 (Beutin *et al.* 2007, 2008; Staples *et al.* 2012). Además, las muestras fecales, de alimentos y ambientales suelen tener una mezcla de un gran número de bacterias que pueden producir toxinas diferentes a VT, pero con la misma actividad sobre las células Vero o Hela, por lo que este tipo de pruebas pueden producir resultados no concluyentes (Beutin y Fach, 2014). Para análisis de rutina se usan con poca frecuencia, ya que son pruebas muy laboriosas, necesitan equipamiento específico y personal cualificado, y además, requieren de al menos 72 h para su lectura (Paton y Paton, 1998).

Se han desarrollado diferentes pruebas inmunológicas para la detección de verotoxinas, como la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), la de aglutinación con partículas de látex, sistemas inmunocromatográficos o de transferencia de colonia (colony immunoblot); casi todas disponibles comercialmente.

Se ha evaluado la sensibilidad y especificidad de numerosos kits comerciales de ELISA, inmunocromatografía y aglutinación con partículas de látex, demostrando que estos sistemas presentan numerosas limitaciones (Beutin *et al.* 1996, 2002, 2007, 2010; Karmali *et al.* 1999; Kehl, 2002; Segura-Álvarez *et al.* 2003; Feng *et al.* 2011; Burgos y Beutin, 2012; Parma *et al.* 2012; Staples *et al.* 2012). Tan solo el método de inmunoblot (electrotransferencia) parece superar la mayoría de las limitaciones presentadas por los métodos anteriores, hasta el punto de que la legislación alemana ha establecido su uso sistemático en los laboratorios de inspección de alimentos de dicho país (Beutin *et al.* 2010).

Las pruebas basadas en el ADN o de biología molecular, como la PCR convencional y más recientemente la PCR en tiempo real (RT-PCR), son desde hace años las herramientas más utilizadas para la detección de ECVT en todos los laboratorios del mundo, tanto por su rapidez, como por la sensibilidad y especificidad que presentan.

Hoy en día, la RT-PCR ha sustituido en gran medida a la convencional por ser más rápida, sensible y específica; además, su potencial de automatización la convierte en la herramienta más adecuada para el análisis de un gran número de muestras. Existen numerosos tests comerciales de RT-PCR validados por AFNOR (Association Française de Normalisation) o AOAC (Association of analytical communities) como: ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System for *E. coli* (AES Chemunex), Assyrabce GDS™ Shiga Toxin Genes (BioControl Systems), iQ-Check™ *E. coli* O157:H7 (Bio-Rad) y McroSEQ® *E. coli* O157:H7 Detection Kit (Applied Biosystems), entre otros (Farrokh *et al.* 2013).

Existen dos métodos de referencia basados en RT-PCR para la detección en alimentos de los tipos de ECVT más importantes. El primero es el método oficial utilizado en EE.UU. para productos cárnicos (MLG 5B.01) (USDA, 2011a). El segundo, ha sido estandarizado a nivel europeo e internacional por la Comisión Europea de Normalización (CEN) y por la Organización Internacional de Estandarización (ISO, 2012) (ISO/TS 13136:2012), norma en la que se han basado para la validación del método para la identificación y caracterización de los ECVT por RT-PCR del Laboratorio de Referencia Europeo para *E. coli* (VTEC_Method_02_Rev0, 2013) (EU-RL, 2013a).

A pesar de todas las ventajas de la RT-PCR y de la estandarización de su uso, aún presenta algunas limitaciones, como fallos en la PCR provocados por compuestos inhibidores presentes en los alimentos (Bélangier *et al.* 2002; Stefan *et al.* 2007; Auvray *et al.* 2009; Fratamico *et al.* 2009, 2011; Derzelle *et al.* 2011); fallos en la detección de algunas variedades de VT (Beutin *et al.* 2009; Reischl *et al.* 2002; Margot *et al.* 2013) y valores de C_T (número de ciclos necesarios para que la fluorescencia cruce el umbral establecido) confusos en muestras con un número bajo de bacterias positivas por gramo de muestra (LREC, datos no publicados).

1.8.2. Caracterización de ECVT

Una vez detectada la presencia de ECVT en una muestra y, en su caso, aisladas las cepas, la caracterización puede realizarse mediante métodos fenotípicos (serotipado, biotipado, tipado de colicinas, fagotipado, resistencia a antibióticos, etc.) (Beutin y Fach, 2014) o mediante tipado molecular (Karama y Gyles, 2010).

Una de las herramientas de tipado molecular más utilizadas en el marco de la epidemiología local es la electroforesis en campo pulsante (PFGE), que proporciona resultados altamente discriminativos a la hora de comparar cepas pertenecientes al mismo serotipo (Keskimaki *et al.* 2001; Nielsen *et al.* 2006). Este método, ampliamente utilizado a nivel mundial, ha sido avalado recientemente por la EFSA, al otorgarle, en la evaluación de métodos de tipado molecular, la máxima calificación en base a 3 criterios: a) vigilancia de rutina de enfermedades, b) seguimiento y control de brotes y c) seguimiento y control de casos puntuales que afecten a la salud pública (EFSA/ECDC, 2014).

La herramienta de tipado de análisis de repeticiones en tándem en número variable de diferentes locus (MLVA) suele utilizarse como complemento de la PFGE para un mayor grado de discriminación. En la valoración de la EFSA/ECDC (2014), fue el segundo método de tipado mejor valorado. Sin embargo, los protocolos estandarizados actualmente solo permiten el tipado de ECVT O157, lo que representa una gran limitación para esta técnica.

En el marco de la epidemiología global, el tipado de secuencias multilocus (MLST) es una herramienta ampliamente utilizada para definir grupos clonales dentro de *E. coli* y establecer las relaciones filogenéticas existentes entre ellos (Karama *et al.* 2010; Chaudhuri y Henderson, 2012).

La llegada de las técnicas basadas en la secuenciación masiva (WGS) han marcado un antes y un después en el tipado molecular. Permitiéndonos entender mejor cualquier variación dentro y entre especies, lo que se traduce en la capacidad de diferenciar organismos con una precisión que no permite ninguna otra tecnología.

El beneficio más prometedor y de mayor envergadura a nivel de seguridad alimentaria de este tipo de técnicas, consiste en la combinación de la información genómica de un patógeno de transmisión alimentaria, con su ubicación geográfica, y la aplicación de los principios de la biología evolutiva para determinar la relación de los agentes patógenos. Puesto que la información genómica de una especie de patógeno transmitida por los alimentos que se encuentran en un área geográfica determinada es diferente de la

información genómica de la misma especie de patógeno que se encuentra en otra área, conocer las áreas geográficas a las que los patógenos están típicamente vinculados puede ser una herramienta muy poderosa en la búsqueda del origen de la contaminación de un producto alimentario. Esto supondría una reducción significativa tanto en costes económicos, como en la morbilidad y mortalidad de los brotes provocados por ECVT, ya que cuanto antes se produzca la identificación de la fuente de contaminación, más rápida será la retirada del mercado del producto (<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenomeSequencingProgramWGS/>).

1.9. Legislación y sistemas de vigilancia en seguridad alimentaria

Aunque la red de vigilancia Epidemiológica y de Control de Enfermedades Transmisibles en la Comunidad fue creada en 1998 (Decisión Nº 2119/98/CE), no es hasta el 2009 (Decisión Nº 2009/312/CE, relativa a las redes especializadas de vigilancia de enfermedades transmisibles), cuando se reconocen las infecciones por *E. coli* enterohemorrágicos como enfermedades de transmisión alimentaria. A consecuencia de esta disposición, los datos de casos de infección por ECVT en humanos deben notificarse trimestralmente al Sistema de Vigilancia Europeo (TESSy).

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005 y su posterior modificación (Reglamento (CE) Nº 1441/2007), establecen los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Tabla 32). Además, en dicho reglamento se describe un dictamen sobre ECVT en los productos alimenticios en que se concluye que es poco probable que la aplicación de normas microbiológicas para ECVT O157 en el producto final produzca reducciones significativas del riesgo asociado para los consumidores. No obstante, el establecimiento de las directrices microbiológicas destinadas a reducir la contaminación fecal a lo largo de la cadena alimentaria puede contribuir a reducir los riesgos para la salud pública, incluido el riesgo relacionado con la ECVT. Por lo tanto, determinaron las siguientes categorías de alimentos en las que la ECVT suponen un riesgo para la salud pública: carne de vacuno y, posiblemente, carne de otros rumiantes, cruda o poco hecha, carne picada y carne de vacuno fermentada y sus productos derivados, leche cruda y productos a base de leche cruda, y productos frescos, en particular, semillas germinadas y zumos de frutas y hortalizas no pasteurizadas.

Tabla 32. Criterios microbiológicos para los productos alimenticios referidos a *E. coli*. Reglamento (CE) Nº 1441/2007 de la Comisión, Anexo I, cap. 2 (Criterios de higiene de los procesos)

	Categoría de alimentos	Plan de muestreo		Límite	
		n	c	m	M
1.25	Moluscos bivalvos vivos y equidermos, tunicados y gasterópodos vivos	1 ^a	0	230 NMP/100 g de carne y líquido intravalvar	
2.1.6	Carne picada	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g
2.1.7	Carne separada mecánicamente (salas de despiece)	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g
2.1.8	Preparados cárnicos	5	2	500 ufc/g	5000 ufc/g
2.2.2	Queso a base de leche o suero sometido a tratamiento térmico	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g
2.2.6	Mantequilla y nata a base de leche cruda o leche sometida a tratamiento térmico inferior a la pasteurización	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g
2.4.1	Productos pelados y descabezados de crustáceos y moluscos cocinados	5	2	1 ufc/g	10 ufc/g
2.5.1	Frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo)	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g
2.5.2	Zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados (listos para el consumo)	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g
ISO TS 16649-3: método analítico de referencia para las categorías 1.25 y 2.4.1. ISO 16649 partes 1 o 2: método analítico de referencia para el resto de las categorías					
^a 1 muestra conjunta de un mínimo de 10 animales					
n: número de unidades que componen la muestra, c: número de muestras que pueden dar valores entre m y M					
Resultado satisfactorio: si todos los valores observados son inferiores o iguales a m					
Resultado aceptable: si un máximo de c valores se encuentran entre m y M y el resto de los valores observados son inferiores o iguales a m					
Resultado insatisfactorio: si uno o varios valores observados son >M o más de c valores se encuentran entre m y M					

No es hasta marzo de 2013, cuando la UE aprueba cuatro reglamentos que enmiendan el Reglamento anterior, e introducen por primera vez en la legislación de la UE criterios microbiológicos específicos para los ECVT: (EU) Nº 208/2013, (EU) Nº 209/2013, (EU) Nº 210/2013 y (EU) Nº 211/2013. Destacar que el Reglamento (EU) Nº 209/2013, que establece criterios microbiológicos para brotes y semillas, señala por primera vez a nivel legislativo, serogrupos concretos (O157, O26, O103, O111, O145 Y O104) como los mayores causantes de SUH en la UE.

El Reglamento (CE) Nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero 2002, establece los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y se fijan los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

El artículo 14 de este Reglamento, prohíbe introducir alimentos no seguros en el mercado. Definiendo un alimento no seguro, como aquel que se considera que es

perjudicial para la salud o no apto para el consumo humano. Una vez que en un alimento se ha identificado un peligro que puede provocar un perjuicio para la salud, debe llevarse a cabo una evaluación del riesgo asociado, teniendo en cuenta el potencial de exposición de los consumidores a este peligro. Esta evaluación de la exposición debe tener en cuenta las condiciones de uso habituales del alimento, tales como el tipo de preparación, y las particularidades dietéticas específicas del consumidor de destino. Por lo tanto, cuando las autoridades competentes se enfrentan a un alimento en el que se ha detectado un peligro potencial, siempre deben tener en cuenta la gravedad del riesgo antes de imponer las medidas correctoras.

Después del último gran brote por ECVT producido en 2011 por consumo de semillas germinadas, la mayoría de los estados miembros de la UE han aumentado significativamente el número de controles oficiales destinados a la detección de la presencia de ECVT en los alimentos. Estos controles se refieren, tanto a los productos alimentarios de importación como a los de producción nacional.

La complejidad de los ECVT está relacionada con la dificultad de la designación como patógenos de serotipos específicos. La plasticidad del genoma, resultado de la adquisición de genes de virulencia procedentes de otras cepas, implica que es probable que con el tiempo, aparezcan de una manera impredecible cepas nuevas e inesperadas. El brote del 2011 por ECVT-ECEA O104:H4 es un ejemplo de la variabilidad genómica mencionada anteriormente.

En abril de 2013, la EFSA publicó un dictamen científico sobre "VTEC-seropatotipo y criterios científicos respecto a la evaluación de la patogenicidad" (EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/3138.pdf>). Este dictamen reconoce que, aunque todavía no es posible definir completamente los ECVT patógenos humanos o identificar los factores de los ECVT que predigan plenamente el potencial patógeno en humanos, una clasificación molecular puede dar una primera aproximación que podría ayudar a las autoridades competentes de los estados miembros a la hora de evaluar el riesgo (de acuerdo con el artículo 14 del Reglamento (CE) Nº 178/2002) en el caso en que se detectaran positivos, y para adoptar las medidas apropiadas para garantizar que el riesgo para los consumidores se reduzca tanto como sea posible.

Como no se han establecido criterios específicos de seguridad alimentaria sobre ECVT en el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios (excepto para semillas y brotes), la gestión de un positivo para ECVT por parte de los estados miembros puede ser complicada.

Basándose en esto, el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, creó la Instrucción Interna IM/04/2014, que establece las directrices a seguir para armonizar la aplicación del artículo 14 del Reglamento (CE) N° 178/2002:

El documento establece una serie de directrices respecto a la presencia de ECVT en los diferentes productos alimenticios, si bien presta especial atención a la carne de vacuno, el enfoque es igualmente aplicable a los diferentes productos alimenticios susceptibles de contaminarse por ECVT.

Identificación de perfiles de alto y bajo riesgo de los alimentos

Los alimentos contaminados con ECVT se deberían clasificar de acuerdo a dos perfiles de riesgo:

- Alimentos de alto riesgo: *en este grupo se incluyen alimentos que estén listos o no para el consumo y que por regla general se consumen sin un tratamiento suficiente para poder eliminar o reducir a un nivel aceptable el riesgo de infección por STEC (por ejemplo carpaccio y alimentos lácteos que se consuman frescos sin tratamiento térmico, como quesos de leche cruda).*
- Alimentos de bajo riesgo: *son aquellos que de forma habitual se someten a un tratamiento adecuado que permita eliminar o reducir a un nivel aceptable el riesgo de infección por STEC (por ejemplo, carne asada) y siempre que se proporcione al consumidor información suficiente (incluyendo, por ejemplo, una mención específica en el etiquetado) para la prevención de los efectos adversos para la salud que se derivan del consumo de un determinado alimento o categoría de alimentos.*

En determinadas circunstancias, puede ser difícil clasificar los alimentos dentro de una de estas categorías, por lo que debe tenerse en cuenta no solo la naturaleza del producto, sino también, si el único destino posible del mismo va a ser o no la producción de alimentos de bajo riesgo.

Plan de muestreo

El plan de análisis y de muestreo debe ser: $n=5$ (siendo n el número de unidades a analizar), $c=0$ (siendo c el número máximo de muestras positivas aceptables) y el límite: ausencia en 25 gramos. Se deberían analizar 5 submuestras de 25 gramos por partida.

Interpretación de resultados

En la Figura 18 y Figura 19 aparecen esquematizadas las interpretaciones de los posibles resultados.

1. En el caso de que se detecte en el alimento la presencia simultánea de los siguientes indicadores moleculares:

- genes vt ($vt1$ o $vt2$) y
- gen eae o genes $aaiC+aggR$

a) Si, con arreglo a lo dispuesto en el apartado anterior, se trata de un producto de alto riesgo, éste se considerará como un alimento no seguro debiendo, en aplicación del artículo 14 del Reglamento (CE) n° 178/2002, procederse al rechazo de la partida.

b) Por el contrario, si se trata de un alimento de bajo riesgo, se procederá al serotipado de forma que:

• Si se detecta la presencia de cualquiera de los siguientes serogrupos o serotipos:

- O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145, O157,
- O91: H21, O113: H21, O5: HNM y O165: H25,
- o uno considerado altamente virulento,

El alimento se considerará no seguro y, por tanto, deberá procederse al rechazo de la partida (en aplicación del artículo 14 del Reglamento (CE) n° 178/2002).

• En caso contrario, es decir, si no se detecta ninguno de los serogrupos arriba enumerados ni uno nuevo altamente virulento, podrá autorizarse el despacho de la partida.

2. En todos los demás casos (es decir, si se detecta uno de los genes vt ($vt1$ o $vt2$) pero no

el gen *eae* o los genes *aaiC+aggR*, si se detecta el gen *eae* o los genes *aaiC+aggR* y no los genes *vt* o si no se detecta ninguno de los genes anteriores) el resultado se considerará favorable.

En todo caso, se tendrán en cuenta las recomendaciones de interpretación que exprese el laboratorio en el informe del ensayo.



Figura 18. Esquema de interpretación de la Instrucción IM/04/2014 para el rechazo de una partida

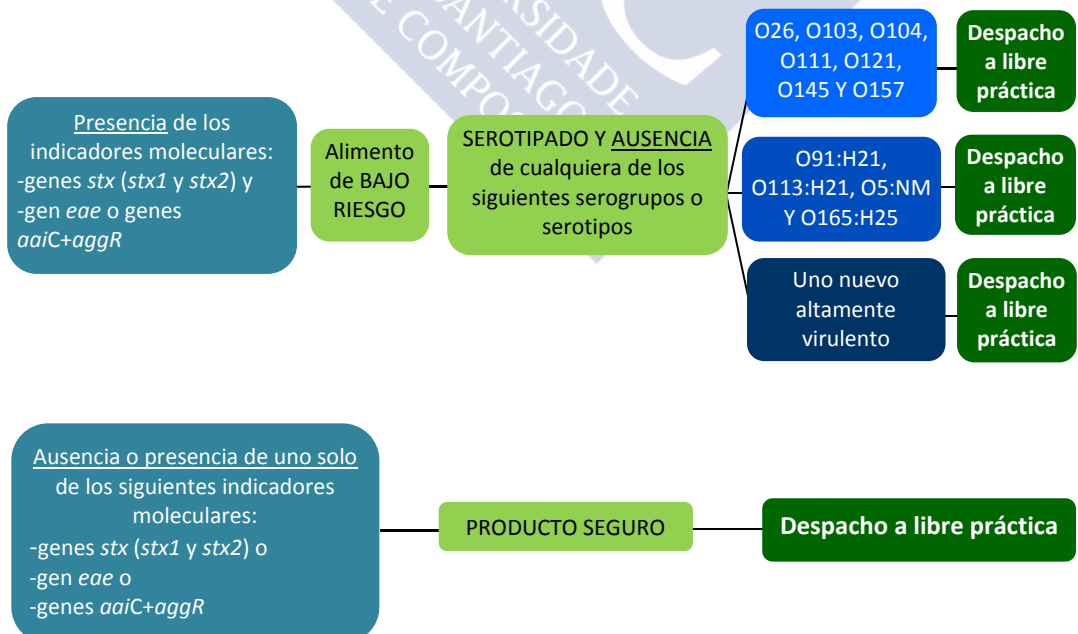


Figura 19. Esquema de interpretación de la Instrucción IM/04/2014 para el despacho libre de una partida

Por lo tanto, la instrucción IM/04/2014 es la herramienta utilizada en España para determinar cuándo un alimento se considera o no seguro para el consumo, en lo que a presencia de ECVT se refiere. Además, amplía a 8 los serogrupos altamente virulentos definidos por el Reglamento (EU) Nº 209/2013, añadiendo el O121 y el O45, e incluye 4 serotipos en la lista de ECVT altamente patógenos (O91:H21, O113:H21, O5:HNM y el O165:H25).

Actualmente, al igual que hizo España con la instrucción IM/04/2014 y basándose también el dictamen científico que la EFSA publicó en 2013, sobre "VTEC-seropatotipo y criterios científicos respecto a la evaluación de la patogenicidad" (EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/3138.pdf>), la Comisión Europea está redactando el borrador del documento de orientación relativo a alimentos contaminados con ECVT, que servirá de marco legal a nivel europeo para la aplicación del artículo 14 del Reglamento (CE) Nº 178/2002.

Al igual que la instrucción interna, este documento será aplicable a todos los productos alimenticios y no proporcionará orientación sobre la forma de vigilancia o monitoreo ECVT que deben llevar a cabo los estados miembros o los productores de alimentos, ni sobre estrategias de muestreo para ECVT en los alimentos, sino que servirá de herramienta de actuación en caso de obtener un positivo para ECVT en un alimento.

El borrador de la nueva norma presenta algunas diferencias importantes respecto a la instrucción IM/04/2014 (Figura 20 y Figura 21):

La nueva norma establece una diferenciación para la interpretación de los resultados en función de si el alimento está listo para la venta al por menor o no.

Para alimentos a nivel de venta al por menor, define 2 perfiles que engloban 3 categorías (a, b y c):

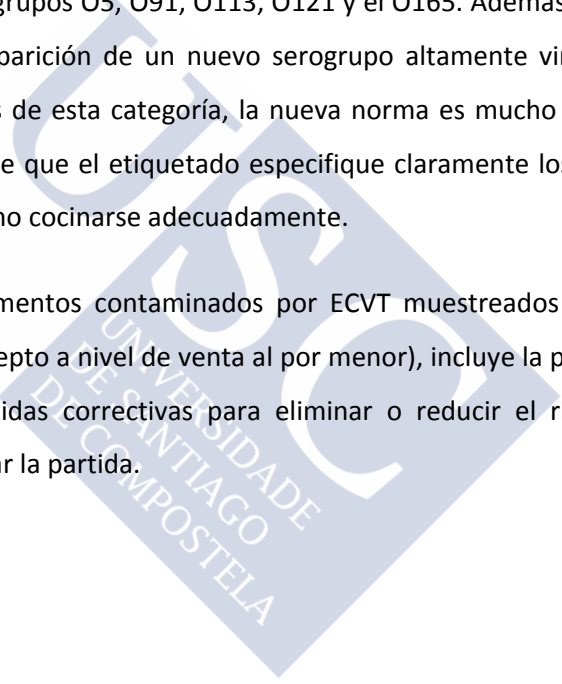
- Perfil 1: para alimentos de alto riesgo.
 - Categoría a: alimentos listos para el consumo.
 - Categoría b: alimentos cuya preparación habitual implique un tratamiento poco eficaz.

Para los alimentos de este perfil, establece que es suficiente con que el positivo sea únicamente para alguno de los genes *vt* para rechazar la partida. Sin embargo, para ello es necesario confirmar el positivo mediante el aislamiento de la cepa.

– Perfil 2: para alimentos de bajo riesgo (categoría c).

Para los alimentos de este perfil, sigue siendo necesario un positivo simultáneo para el gen *vt* y el gen *eae* o los genes *aiiC+aggR*, sin embargo, la nueva norma específica, al igual que en el caso anterior, que es necesario la confirmación mediante el aislamiento de las cepas, y que éstas no pertenezcan a los serogrupos considerados como altamente virulentos, que en este caso excluye, con respecto a la norma vigente (Instrucción [IM/04/2014](#)), a los serogrupos O5, O91, O113, O121 y el O165. Además, no deja margen a la posibilidad de la aparición de un nuevo serogrupo altamente virulento. Por otro lado, para los alimentos de esta categoría, la nueva norma es mucho más concreta en cuanto a la obligación de que el etiquetado especifique claramente los peligros para el consumidor en caso de no cocinarse adecuadamente.

Por otro lado, para alimentos contaminados por ECVT muestreados a lo largo de la cadena alimentaria (excepto a nivel de venta al por menor), incluye la posibilidad de que se puedan aplicar medidas correctivas para eliminar o reducir el riesgo lo máximo posible antes de rechazar la partida.



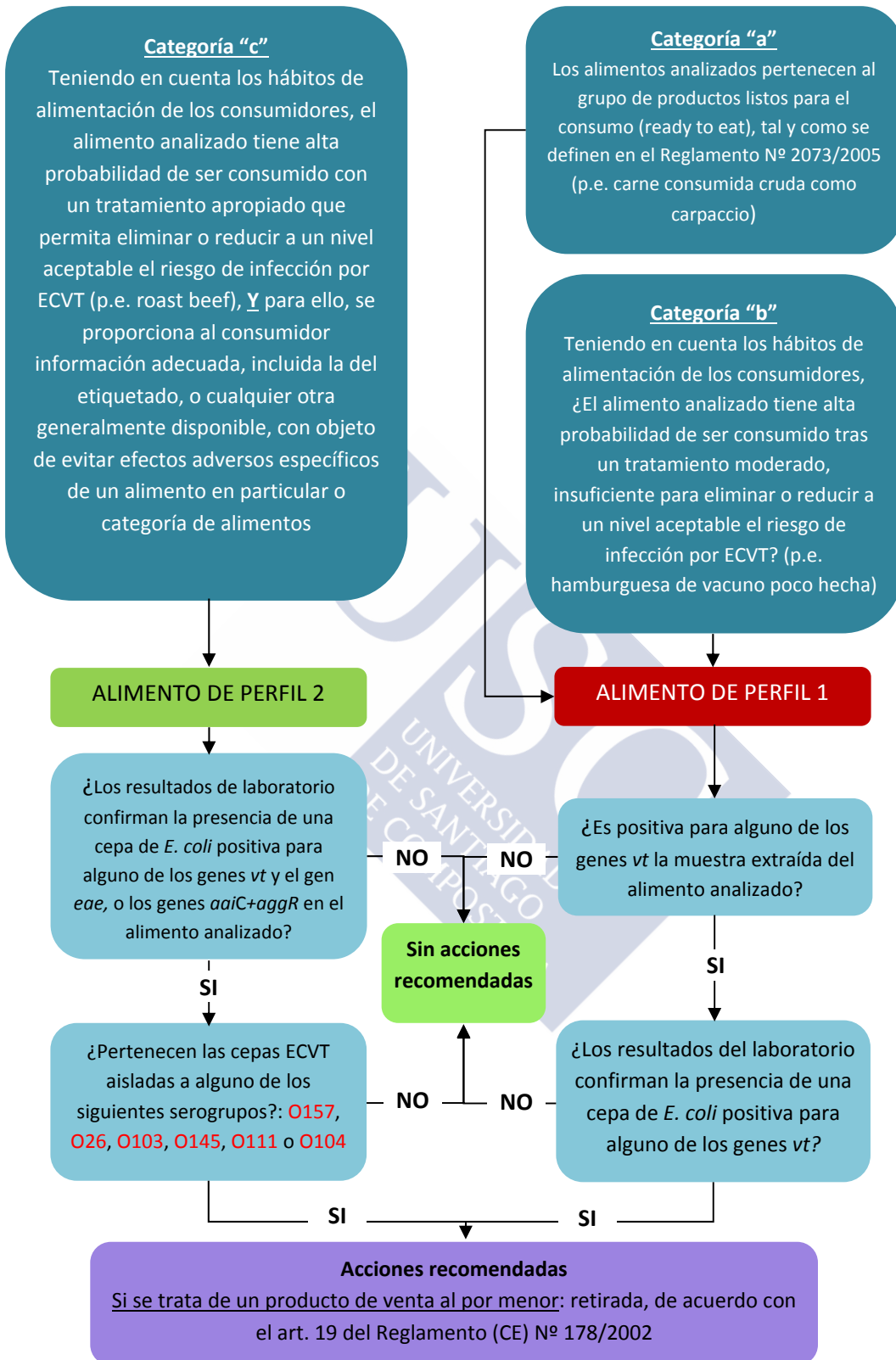


Figura 20. Recomendaciones para la plicación armonizada del artículo 14 del Reglamento (CE) N° 178/2002 en lo relativo a los productos alimenticios contaminados por ECVT muestreados a nivel de venta al por menor

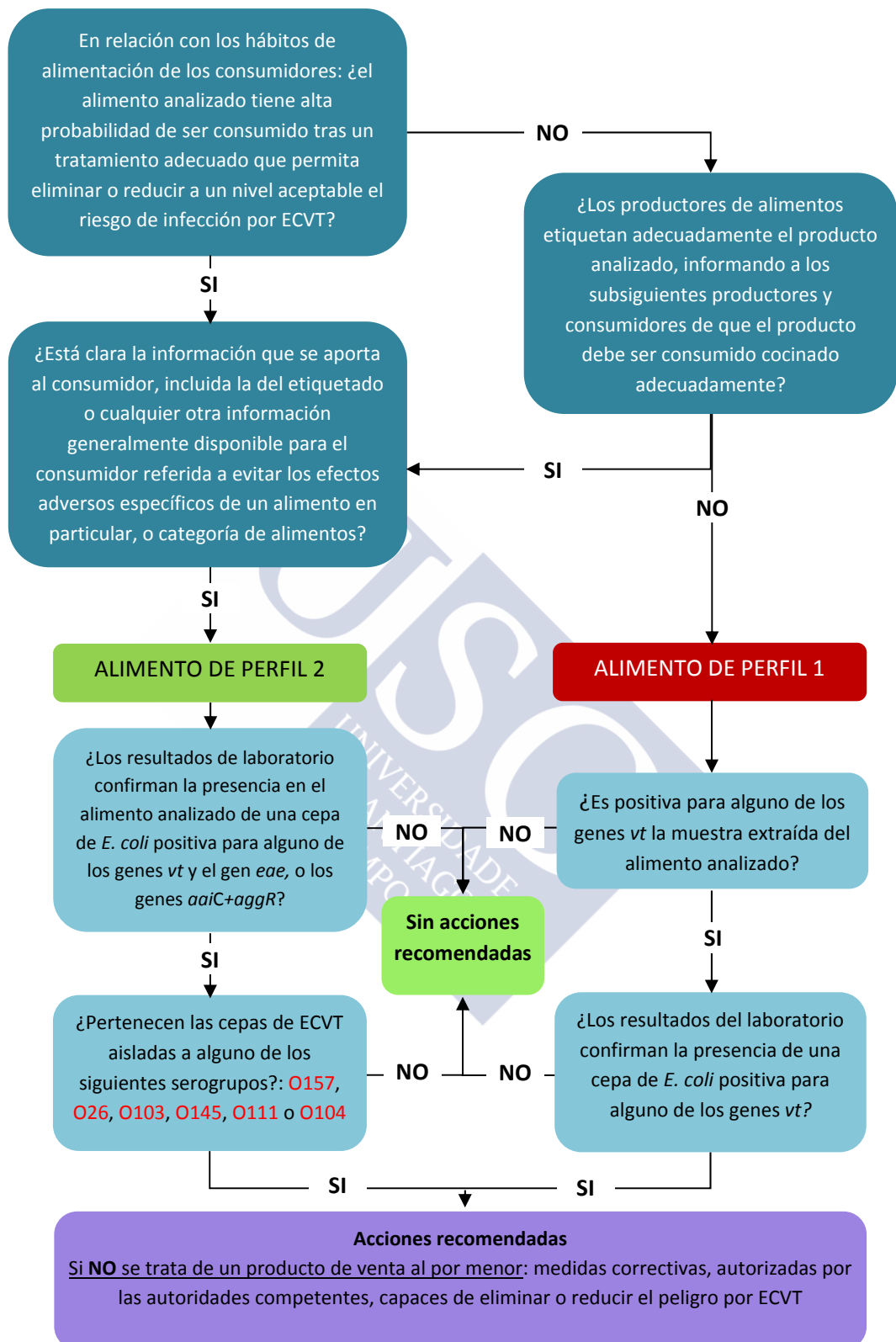


Figura 21. Recomendaciones para la plicación armonizada del artículo 14 del Reglamento (CE) N° 178/2002 en lo relativo a los productos alimenticios contaminados por ECVT muestreados a lo largo de la cadena alimentaria (excepto a nivel de venta al por menor)

Por otro lado, en 2013, el DG SANCO (Directorate-General Health and Consumers) de la Comisión Europea ordenó la organización de la colección de datos de tipado molecular de cepas de ECVT (entre otros) de origen animal y alimentario causantes de infecciones en humanos en los distintos países miembros, creando así una base de datos única que tiene como objetivo, favorecer la vigilancia y el rastreo de brotes de origen alimentario a nivel nacional, europeo e internacional. El manejo de esta base de datos fue asignado a la EFSA con el apoyo científico y técnico de los Laboratorios de Referencia Europeos (EURLs) y los Laboratorios Nacionales de Referencia (NRLs).

Estos datos de tipado molecular de cepas EVCT procedentes de animales, piensos y alimentos se compararían con los de infecciones humanas recogidos por el ECDC dentro del programa de vigilancia de FWD (Food- and water-borne Disease), lo que permitiría la comparación sistemática entre cepas de origen humano y no humano, facilitando así, posibles investigaciones epidemiológicas, particularmente en casos de brotes internacionales (ECDC, 2013; EFSA/ECDC, 2014).

Para ello, la EFSA evaluó los protocolos y técnicas aplicadas por los distintos EURLs con el fin de actualizar y homogenizar la metodología que debe ser aplicada por los distintos países miembros para la caracterización de cepas de ECVT (Tabla 33) (EFSA/ECDC, 2014).

Tabla 33. Características microbiológicas que deben ser reportadas a la EFSA para cepas ECVT aisladas de alimentos, piensos y animales, y métodos para su detección (EFSA/ECDC, 2014)

Características	Método
	Serotipo
Antígeno O	El panel de grupos O que debe ser identificado incluye: O26, O45, O55, O91, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O146, O157. Los antígenos pueden ser identificados tanto fenotípicamente o utilizando métodos moleculares. Métodos fenotípicos: (http://www.ssi.dk/English/HealthdataandICT/National%20Reference%20Laboratories/Bacteria.aspx). Tipado molecular: (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_03_Rev_1.pdf).
Antígeno H	Métodos fenotípicos: (http://www.ssi.dk/English/HealthdataandICT/National%20Reference%20Laboratories/Bacteria.aspx). Tipado molecular de los antígenos H2, H7, H8, H11 and H28 (Madic <i>et al.</i> 2010).
	genes <i>vt</i>
Grupo	Para la identificación de los genes <i>vt1</i> y <i>vt2</i> se utilizará el método de PCR de la página de EURL para <i>E. coli</i> : (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_01_Rev_0.pdf).

Características	Método
Subtipo	Los genes <i>vt1</i> y <i>vt2</i> serán subtipados acorde con el esquema publicado por Scheutz <i>et al.</i> 2012. EL método de PCR está disponible en página de EURL para <i>E. coli</i> : (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_06_Rev_1.pdf).
Otros genes de virulencia	
Intimina	La identificación del gen <i>eae</i> se realizará utilizando el método de PCR de la página EURL para <i>E. coli</i> : (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_01_Rev_0.pdf).
Adhesión Enteroagregativa	Los genes <i>diana</i> para la enteroagregatividad serán el <i>aggR</i> y <i>aiiC</i> . Serán detectados mediante el método disponible en la página web de EURL para <i>E. coli</i> : (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_05_Rev_1.pdf).
Enterohemolisina	El gen <i>E-hly</i> serán detectados utilizando los primers Ehly1 y Ehly5 y el método de PCR descrito por Schmidt <i>et al.</i> 1995a.
Características fenotípicas	
Producción de enterohemolisina	La hemólisis será determinada mediante la siembra de las cepas en agar sangre. Se observará un resultado negativo dentro de las primeras 4-6 h, y un resultado positivo después de 20 h. Solo cuando el correspondiente gen no haya sido testado mediante PCR.
Fermentación del sorbitol (solo para cepas ECVT O157)	La fermentación del sorbitol será determinada mediante la siembra de las cepas en placas de agar MacConkey con 1% de sorbitol en lugar de lactosa. Una reacción positiva debe ser observada dentro de las primeras 20 h.
Fermentación de la Ramnosa (solo para cepas ECVT O26)	La fermentación de la ramnosa será determinada mediante la siembra de las cepas en placas de agar MacConkey con 1% ramnosa en lugar de lactosa. Una reacción positiva debe ser observada dentro de las primeras 20 h.





OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Debido a la dificultad que supone la detección y el aislamiento de los *Escherichia coli* diarreagénicos en alimentos, son muy pocos los laboratorios a nivel mundial que realizan la investigación de todos los patotipos de forma sistemática. Desde el año 1995, el LREC viene realizando la investigación de ECVT en carne picada de vacuno puesta a la venta en las carnicerías de la ciudad de Lugo, y desde el año 2009 se ha ampliado el análisis a otros alimentos de origen animal y vegetal. Desde marzo del año 2005, se está también realizando el estudio del resto de los grupos de *E. coli* diarreagénicos, así como de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE y del grupo clonal ST131 para conocer el riesgo existente para la salud pública.

En el presente estudio nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Conocer la calidad microbiológica de diferentes tipos de alimentos, cárnicos y vegetales, puestos a la venta en distintos establecimientos de la ciudad de Lugo, así como de productos lácteos y carnes de importación antes de su puesta en circulación, determinando el número más probable de *E. coli* por gramo de alimento (NMP).
2. Estudiar la presencia en dichos alimentos de cepas de *Escherichia coli* diarreagénicas.
3. Conocer las características (serotipos, genes de virulencia, patrones de resistencia y perfiles de macrorrestricción) de las cepas de *E. coli* diarreagénicas aisladas, centrándonos fundamentalmente en las cepas ECVT, con objeto de conocer su potencial patógeno, grado de clonalidad y similitud con cepas de origen humano.
4. Analizar el papel de los alimentos en la transmisión al hombre de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), y del grupo clonal pandémico O25b:H4-B2 (ST131).



MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas control y conservación de las cepas

En todos los ensayos se emplearon cepas control positivas y negativas para las características a estudiar. En la Tabla 34 se listan las cepas control utilizadas.

Las cepas de *E. coli* aisladas y caracterizadas en este estudio, al igual que todas las cepas control, se conservaron sembrándolas por picadura en agar nutritivo con 0,75% (p/v) de agar y se conservaron a temperatura ambiente en tubos vacutainers estériles. En estas condiciones las cepas de *E. coli* mantienen su viabilidad, sin necesidad de resiembra, al menos 5 años. Para preparar agar nutritivo con 0,75% (p/v) de agar, se mezcla agar nutritivo (11,5 g/l) (Difco) y caldo nutritivo (4 g/l) (Difco).

Tabla 34. Cepas control de referencia

Cepa control	Genes
<i>E. coli</i> diarreagénicos	
EDL-933	<i>vt1, vt2, eae, eae-γ1, O157 rfbE, fliC_{h7}, E-hlyA</i>
O157-156	<i>vt1, vt2, eae, eae-γ1, O157 rfbE, fliC_{h7}, E-hlyA</i>
O157-41	<i>vt2, eae, eae-γ1, O157 rfbE, fliC_{h7}, stcE</i>
O157-1103	<i>vt1, vt2, eae, eae-γ1, O157 rfbE, fliC_{h7}, stcE</i>
IH2859f	<i>eae, bfpA</i>
VTB-198	<i>subA, saa</i>
FV4971	<i>saa</i>
FV168	<i>pCDV432, aaiC, aggR</i>
FV17952	<i>aggR, aaiC</i>
EIEC-26	<i>inv</i>
FV18218	<i>eltA, est</i>
FV18220	<i>est</i>
<i>E. coli</i> extraintestinales	
FV9157	<i>α-hlyA</i>
FV17137	<i>rfbO25b, fliC_{h4}</i>
FV9873	<i>afa/draBC</i>
FV10041	<i>chuA, yjaA, TSPE, ibeA, KpsM II, KpsM II-K2, fimH, fimA_{VM78}, papEF, iroN, malX, papG III, sfa/focDE, cnf1, hlyA, neuC-K1, usp, uidA</i>
FV10042	<i>papG I, kpsM II-K5, chuA, yjaA, TSPE, KpsM II, KpsM II-K2, fimH, papEF, iroN, malX, cnf1, hlyA, neuC-K1, usp, uidA</i>
FV10043	<i>papG II, sat, chuA, yjaA, TSPE, KpsM II, KpsM II-K2, fimH, papEF, iroN, malX, cdtB, kpsM II-K5, sat, usp, uidA</i>
FV10044	<i>YjaA, hlyE, iucD, iutA, traT, tsh, cvaC, iss</i>
FV10045	<i>papG II, sat, YjaA, iucD, iutA, traT, afa/draBC</i>
FV17134	<i>KpsM III</i>
FV7392a	<i>papG I</i>
BLEE	
FV9650	<i>bla_{CTX-M}, bla_{CTX-M-15}, bla_{CTX-M} grupo 1, bla_{CTX-M} grupo 9, bla_{TEM}</i>
FV9649	<i>bla_{CTX-M}, bla_{CTX-M-15}, bla_{CTX-M} grupo 1, bla_{CTX-M} grupo 9, bla_{TEM}</i>
FV10798	<i>bla_{SHV}</i>
FV10794	<i>bla_{SHV}</i>
FV17090	<i>fimH, rfbO25b, fliC_{h4}, bla_{CTX-M}, bla_{CTX-M-15}</i>
H2397	<i>bla_{CTX-M-14b}</i>
H3066	<i>bla_{CTX-M14a}</i>

Cepa control	Genes
VARIEDADES VT	
FV15144	<i>vt1a, vt2a, eae-γ1, E-hlyA</i>
FV15145	<i>vt1c, vt2b</i>
FV15146	<i>vt1d</i>
FV15147	<i>vt1a, vt2a, E-hlyA</i>
FV15148	<i>vt2b</i>
FV15149	<i>vt2b, vt2c</i>
FV15150	<i>vt2d</i>
FV15151	<i>vt2e</i>
FV15152	<i>vt2f</i>
FV15153	<i>vt2g</i>
INTIMINAS	
FV10087	<i>eae-α1</i>
FV10091	<i>eae-α2</i>
FV10096	<i>eae-β1</i>
FV10098	<i>eae-β2B</i>
FV10101	<i>eae-β3</i>
FV10112	<i>eae-δ/k</i>
FV10106	<i>eae-γ1</i>
FV10111	<i>eae-θ/γ2</i>
FV10116	<i>eae-ε1</i>
FV10118	<i>eae-ε2</i>
FV10121	<i>eae-ε3</i>
FV10123	<i>eae-ε4</i>
FV10125	<i>eae-ζ</i>
FV10127	<i>eae-η1/η2</i>
FV10127	<i>eae-η1</i>
FV10129	<i>eae-η2</i>
FV10130	<i>eae-ι1</i>
FV10133	<i>eae-ι2</i>
FV10134	<i>eae-λ</i>
FV10137	<i>eae-μB</i>
FV10140	<i>eae-νB</i>
B49	<i>eae-ξB</i>
FV10145	<i>eae-ο</i>
FV10147	<i>eae-π</i>
FV10149	<i>eae-ρ</i>
FV10152	<i>eae-σ</i>
ANTÍGENOS O Y H	
FV17090	<i>rfbO25b</i>
LREC-O26	<i>wzx-O26</i>
LREC-O45	<i>wzy-O45</i>
LREC-O91	<i>wzx-O91</i>
LREC-O103	<i>wzx-O103</i>
LREC-O104	<i>wzx-O104</i>
LREC-O111	<i>wzx-O111</i>
LREC-O121	<i>wzy-O121</i>
LREC-O145	<i>wzy-O145</i>
LREC-O146	<i>wzx-O146</i>
LREC-O157	<i>O157 rfbE</i>
LREC-H4	<i>fliC_{h4}</i>
LREC-H7	<i>fliC_{h7}</i>
LREC-H11	<i>fliC_{h11}</i>
LREC-H10	<i>fliC_{h10}</i>
LREC-H21	<i>fliC_{h21}</i>

3.2. Muestras de alimentos

Se analizaron un total de 1.253 muestras de alimentos, incluidas 950 obtenidas por muestreo directo en puntos de venta al consumidor en la ciudad de Lugo, 171 procedentes de carnes y 132 procedentes de productos lácteos remitidas por diferentes entidades al LREC para su análisis antes de la puesta en circulación con destino al consumidor.

De forma detallada, las 950 muestras recogidas en puntos de venta, fueron adquiridas de 24 mercados, supermercados y pequeños establecimientos de la ciudad de Lugo, en el periodo comprendido entre septiembre 2009 y noviembre 2012. Se recogieron 600 muestras de carne y 350 de productos agrícolas (Tabla 35).

- Carne de vacuno: se recogieron 200 muestras de carne de vacuno picada (entre octubre de 2011 y julio de 2012), 110 de carne picada fresca con un tamaño de muestreo de 150 g; y 90 de carne picada envasada en atmósfera modificada, con un tamaño de muestreo que varió de 200 g a 500 g, según la presentación del producto.

- Carne de cerdo: se recogieron 200 muestras de carne de cerdo picada (entre enero de 2011 y junio de 2012), 155 de carne picada fresca con un tamaño de muestreo de 150 g; y 45 de carne picada envasada en atmósfera modificada, con un tamaño de muestreo que varió de 200 g a 500 g, según la presentación del producto.

En el caso de las muestras de carne picada de vacuno y cerdo frescas, el picado se realizó en el propio establecimiento con la máquina picadora destinada para este fin.

- Carne de ave: se recogieron 200 muestras de pechuga de pollo (entre septiembre de 2009 y diciembre de 2010), 170 de pechugas frescas con un tamaño de muestreo de 200 g aproximadamente; y 30 bandejas de pechugas de pollo envasadas en atmósfera modificada, con un tamaño de muestreo que varió de 200 g a 500 g, según la presentación del producto.

- Productos agrícolas: se recogieron un total de 350 muestras (entre junio de 2011 y noviembre 2012) que incluían: 125 ensaladas envasadas listas para el consumo; y 225 verduras y hortalizas variadas en fresco (lechugas, tomates, pepinos, brotes de soja,

brotos de alfalfa, brécol, pimiento rojo, pimiento verde, endivias, puerros, zanahorias y cebolletas).

Todos los alimentos se transportaron a 4 °C hasta el laboratorio para su procesamiento, realizado siempre antes de transcurridas 2 h desde su recogida.

- Las 171 muestras de carne remitidas por entidades externas para el análisis de ECVT, entre marzo de 2013 y mayo de 2014, llegaron en 33 partidas de 5 submuestras (31 lotes de carne de vacuno y 2 de ovino) y 6 partidas de 1 única unidad (carne de vacuno). En total se analizaron 161 submuestras de carne de vacuno (piezas deshuesadas) y 10 de carne de ovino (paletas), precintadas y refrigeradas, procedentes de Argentina, Uruguay, EE.UU., Brasil y Nueva Zelanda para el análisis de ECVT.
- Por último, los 132 productos lácteos de origen ovino (recibidos entre julio de 2011 y noviembre de 2014), provenientes de distintos puntos del proceso de elaboración de quesos: 70 cuajadas de la fase de coagulación, 46 quesos en fase de maduración (de 100 a 120 días de curado) y 16 quesos como producto final (7 meses de curado), remitidos por entidades externas para el análisis de ECVT.

Tabla 35. Relación de muestras recogidas en distintos puntos de venta de la ciudad de Lugo (2009-2012)

Alimento	Origen	Fecha	Presentación	
			Fresca	Envasada
Carne de vacuno	Muestreos, Lugo	oct 2011-jul 2012	110 (picada)	90 (picada-atm. modificada)
Carne de cerdo	Muestreos, Lugo	ene 2011-Jun 2012	155 (picada)	45 (picada-atm. modificada)
Carne de pollo	Muestreos, Lugo	sep 2009-dic 2010	170 (picada)	30 (picada-atm. modificada)
P. agrícolas	Muestreos, Lugo	jun 2011-nov 2012	225	125 (ensaladas envasadas)
Carne de vacuno	Entidades externas	mar 2013-may 2014		171 (piezas deshuesadas-al vacío)
Carne de cordero				10 (paletas-al vacío)
Cuajada Fase de coagulación	Entidades externas	jul 2011-nov 2014	70	
Quesos Fase de maduración (100-120 días de curado)			46	
Quesos Producto final (7 meses de curado)			16	

3.3. Determinación del número más probable (NMP) de *E. coli*

Para el recuento del NMP de *E. coli* por gramo se utilizó el sistema Petrifilm™ Select *E. coli* (3M, Petrifilm™ Select *E. coli* count plates). Este método se basa en que aproximadamente un 97% de las cepas de *E. coli* producen β -glucuronidasa, que al reaccionar con un indicador presente en el medio produce colonias de color verde oscuro o azul verdoso (Figura 22).

Se trata de un método reconocido internacionalmente (certificado AFNOR N° 3M 01/8-06/01, ISO 16649-2 *E.coli* method), y que resulta muy efectivo para el recuento de *E. coli* por gramo en alimentos, pero no para el recuento ni la detección de *E. coli* patógenos.

El procedimiento utilizado es el recomendado por el fabricante:

- Pesar asépticamente 25 g del alimento y añadirlos a 225 ml de agua de peptona tamponada (APT) en una bolsa estéril de doble filtro. Homogenizar en un Stomacher durante 90 s constituyendo un dilución 1:10.
- Levantar la película superior del Petrifilm™ e inocular 1 ml de la dilución 1/10 de la muestra problema en el centro de la placa. Posteriormente, bajar la película cuidadosa y lentamente para evitar la formación de burbujas y presionar ligeramente con el aplicador para distribuir uniformemente la muestra en la superficie de la placa.
- Incubar a 44 °C durante 24 h.

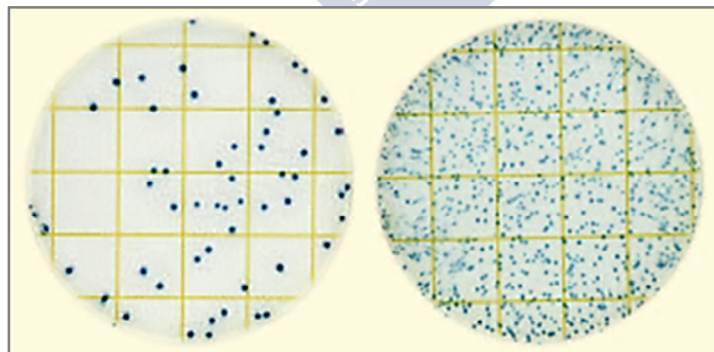


Figura 22. Placas Petrifilm™ Select *E. coli* 3M

- Contar las colonias de color azul verdoso (Figura 22).
- Confirmar las colonias como *E. coli* mediante identificación bioquímica (API®10, Biomérieux).

- Confirmadas las colonias como *E. coli* se hace el cálculo del NMP, multiplicando el número de colonias confirmadas por el factor de dilución.

En los casos en los que no ha habido crecimiento de colonias, el NMP de *E. coli* será considerado como <10 *E. coli* por gramo de alimento, en ningún caso como cero, ya que no podemos garantizar la ausencia absoluta de colonias de *E. coli* por gramo de alimento.

3.4. Detección de cepas de *E. coli* diarreagénicas, ST131 y productoras de BLEE

En la Tabla 36 se esquematiza el protocolo seguido para la detección de *E. coli* diarreagénicos en las muestras de alimentos. Este protocolo incluye dos métodos, el método A desarrollado específicamente para la detección del ECVT O157 y el método B, diseñado para la detección de las distintas cepas de *E. coli* diarreagénicas, del grupo clonal ST131 y productoras de BLEE.

Tabla 36. Protocolo utilizado para la detección de ECVT, otras categorías de *E. coli* diarreagénicos y de cepas ST131 y productoras de BLEE

MÉTODO A Detección de ECVT O157	MÉTODO B Detección de ECVT O157 y no O157, otras categorías de <i>E. coli</i> diarreagénicos y cepas ST131 y productoras de BLEE
25 g de alimento 225 ml de APTvcc – 37 °C/6 h	25 g de alimento 225 ml de APT – 37 °C/6 h*
Separación Inmagnetética (SIM) Dynabeads anti- <i>E. coli</i> O157	1 ml a 9 ml de caldo MacConkey 37 °C/18 h y 44 °C/18 h (por duplicado)
Aislamiento después de la SIM en: (A-1) agar MACSTC- 37 °C/18 h (A-2) agar MACS- 37 °C/18 h	Aislamiento en: (B-3) agar MACL - 37 °C/18 h (B-4) agar MACSTC – 37 °C/18 h (B-5) agar MACL – 44 °C/18 h (B-6) agar MACSTC – 44 °C/18 h
PCR del crecimiento confluyente en MACSTC y MACS para la detección de los genes codificadores de verotoxinas (vt1 y vt2), la intimina específica de ECVT O157 (<i>eae-γ1</i>) y los antígenos O157 y H7	PCR del crecimiento confluyente para la detección de los genes vt1 y vt2 y los genes específicos de ECEPT y ECEPa (<i>eae</i> , <i>bfpA</i>), así como para los genes de cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE (<i>bla_{CTX-M}</i> y <i>bla_{SHV}</i>) y el gen que codifica para el antígeno O25b (<i>rfbO25b</i>) asociado al clon ST131 (B-3, B-4, B-5 y B-6). Detección de genes específicos de otras categorías de <i>E. coli</i> diarreagénicos (B-3 y B-5)
En caso de PCR ⁺ para alguno de los genes buscados: Seleccionar 10 colonias sorbitol negativas y analizarlas individualmente mediante PCR para los genes que codifican para (VT1, VT2, O157, H7 y la intimina γ1).	En caso de PCR ⁺ para alguno de los genes seleccionados, seleccionar 50 colonias y hacer la PCR conjuntamente en grupos de 10 colonias. A continuación, repetir la PCR individualmente en los grupos positivos.
En caso de PCR ⁺ para los genes buscados, confirmar para los antígenos O157 y H7 mediante serotipado	Determinación del serotipo O:H de las cepas ECVT, ECEA, ECEPT, ECEPa, ECET, ECEI, O25b (ST131) y productoras de BLEE localizadas.
*Continuar la incubación de los cultivos de APT sin antibióticos hasta las 18-24 h. A continuación, realizar el análisis por PCR para la detección de genes asociados a ECVT (vt1, vt2, eae, wzx-O104, O157 rfbE), a ECEA (<i>aaIC</i> , <i>aggR</i> , pCDV432) y a ECEPT (<i>eae</i> , <i>bfpA</i>). En caso de PCR ⁺ para alguno de los genes buscados, realizar un aislamiento en MACL y MACSTC seguir con los pasos de los protocolos B-3 y B-4.	

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- Agua de peptona tamponada sin antibiótico (APT) (Cultimed).
- Agua de peptona tamponada con vancomicina, cefixima y cefsulodín (APTvcc).
- Agar MacConkey sorbitol (MACS) (Oxoid).
- Agar MacConkey sorbitol con telurito y cefixima (MACSTC) (Oxoid).
- Agar MacConkey lactosa (MACL) (Oxoid).
- Tryptone soy agar (TSA) (Oxoid)
- Caldo MacConkey (PURPLE) (Oxoid).

3.4.1. Separación inmunomagnética (SIM) para la captura del antígeno O157

En el Método A para la detección específica del ECVT O157 de nuestro protocolo (Tabla 36) se incluyó la técnica de la SIM para la captura del antígeno O157.

Las Dynabeads® utilizadas en la SIM son perlas de polímero de tamaño uniforme que exhiben propiedades magnéticas solo cuando están dentro de un campo magnético y no muestran magnetismo residual al retirarlas del mismo. Cuando las agregamos a una suspensión heterogénea, las Dynabeads® se unirán al blanco (células, ácidos nucleicos, proteínas u otras biomoléculas). Esta interacción está basada en la afinidad específica del ligando sobre la superficie de las Dynabeads®. El complejo resultante puede ser separado de la suspensión usando un imán (MPC, Magnetic Particle Concentrator). Los complejos se unen a la superficie del tubo cercana al imán y así el sobrenadante puede ser eliminado con una pipeta.

La SIM para la captura del antígeno O157 (Dynabeads® anti-*E. coli* O157, Life Technologies™) emplea perlas tapizadas con anticuerpos anti-O157 que se unen específicamente al antígeno O157 de *E. coli*. Dichas perlas se añaden a la muestra problema (heces de pacientes o de portadores, alimentos responsables de la toxiinfección alimentaria, etc.) que se ha preincubado previamente.

El procedimiento empleado en la SIM fue el recomendado por el fabricante, basado en el originalmente descrito por Chapman y colaboradores (1994):

- Pesar asépticamente 25 g del alimento y añadirselos a 225 ml de APT (Cultimed) con

vancomicina (8 mg/l), cefixima (0,05 mg/l) y cefsulodín (10 mg/l). Estos antibióticos inhiben el crecimiento de gram positivos, aeromonas y *Proteus*, respectivamente. Incubar (6 h/37 °C).

- Retirar la banda magnética del concentrador magnético de partículas (Dynal MPC®-S, Dynal®), colocar tantos viales eppendorf como muestras problema y pipetear 20 µl de Dynabeads anti-*E. coli* O157 en cada tubo.
- Homogeneizar el caldo de preenriquecimiento inoculado con la muestra. Pipetear 1 ml de la suspensión, añadirlo al tubo eppendorf con los 20 µl de Dynabeads® e incubar en agitación (60 min/temperatura ambiente).
- Insertar la banda magnética en el MPC y esperar 5 min. Las partículas magnéticas quedarán unidas a la pared en la que se localizan los imanes. Eliminar la suspensión, aspirando lentamente con una pipeta Pasteur. Retirar la banda magnética.
- Añadir 1 ml de PBS-tween (PBS con 0,002% de Tween 20, Sigma). Invertir el MPC dos o tres veces para homogeneizar la suspensión. Insertar la banda magnética, esperar 3 min y retirar la suspensión. Repetir este lavado dos veces más y resuspender el complejo bacterias-partículas en 30 µl de PBS-tween.
- Añadir 15 µl de la suspensión a una placa de MACS y los restantes 15 µl a otra placa de agar MACSTC. Aislar e incubar (37 °C/18 h) (Figura 23).

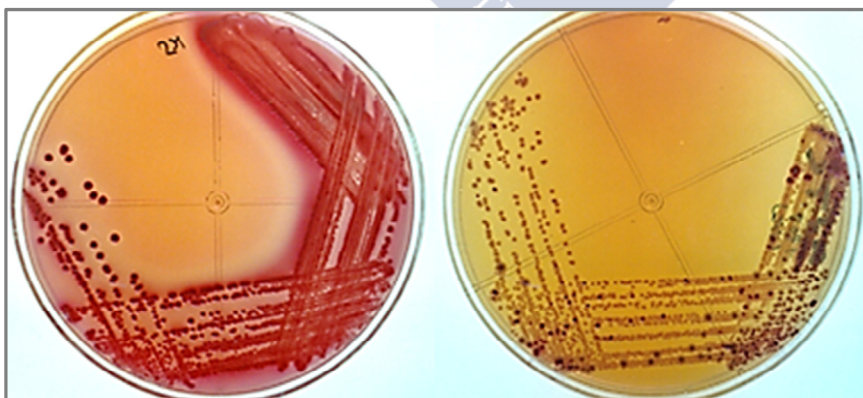


Figura 23. Crecimiento en agar MacConkey sorbitol antes y después de realizar la SIM con una muestra fecal de un paciente con SUH. En la placa de la izquierda pueden apreciarse las típicas colonias de *E. coli* Sorbitol (+) de color rosa intenso. En la placa de la derecha puede observarse como la SIM ha permitido poner de manifiesto la presencia en la muestra de colonias de *E. coli* O157 Sorbitol (-) de color rosa pálido que al estar presentes en una concentración muy baja no se hubiesen podido detectar sin esta técnica inmunológica (Blanco JE *et al.* 2004)

3.4.2. PCR convencional

La presencia de cepas de *E. coli* portadoras de genes de virulencia de los diferentes patotipos de *E. coli* diarreagénicos y de ExPEC, y de genes que codifican para el antígeno O25b y enzimas BLEE, así como su caracterización, se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), utilizando primers (cebadores) específicos (Tabla 37 a Tabla 45). En todas las reacciones de PCR se incluyeron cepas control de los genes diana (Tabla 34).

EXTRACCIÓN DEL ADN

A. A partir de las muestras de alimentos

El protocolo de procesamiento de las muestras de alimentos para obtener el aislamiento bacteriano figura en la Tabla 36.

- Recoger con un asa estéril el crecimiento aproximado de 1/6 de la zona de crecimiento confluyente de la placa de cultivo, y suspenderlo en 300 μ l de agua bidestilada estéril contenidos en un tubo eppendorf.
- Calentar la suspensión (100 °C/3-5 min).
- Centrifugar la suspensión calentada (11.000 rpm/2 min).
- Tomar 10 μ l del sobrenadante y diluirlos con 90 μ l de agua bidestilada estéril, constituyendo una dilución 1:10.
- De la dilución 1:10, recoger 7 μ l de ADN para la prueba.

B. A partir de cultivos puros

- Sembrar la cepa problema o reaislar 1 colonia en TSA e incubar (37 °C/18 h).
- Recoger con un asa estéril el crecimiento equivalente a 1 o 2 colonias y suspender en 300 μ l de agua bidestilada estéril contenidos en un tubo eppendorf.
- Calentar la suspensión 100 °C/3-5 min.
- Centrifugar la suspensión calentada (11.000 rpm/2 min).
- Del sobrenadante se toman 7 μ l para la prueba.

MEZCLAS DE REACCIÓN

La mezcla de reacción se prepara para un volumen final de 30 μ l. Contiene:

- El ADN extraído de la muestra problema (7 μ l).
- Los primers específicos (0,2-0,5 μ M)
- Buffer coloreado 5X My Taq™ Red Reaction Buffer (Bioline) (6 μ l), que incluye: dNTPs, Tris HCl 10 mM (pH 8,8), Cl₂Mg 1,5 mM, ClK 50 mM.
- 1 unidad de polimerasa (MyTaq™ DNA polymerase, BIOLINE) (0,2 μ l).
- Agua bidestilada estéril hasta completar los 30 μ l del volumen final.

AMPLIFICACIÓN

La amplificación se llevó a cabo en termocicladores (modelo 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems). Las mezclas de reacción fueron sometidas a:

- Desnaturalización inicial (94 °C/3 min).
- Seguida de 35 ciclos de 94 °C/1 min (desnaturalización), T^a de hibridación/40 s (acoplamiento de la polimerasa) y 72 °C/2 min (polimerización).
- Polimerización final 72 °C/3min.

REVELADO DE LOS RESULTADOS

Los productos amplificados en las pruebas de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Seakem® LE agarose, Lonza) al 2% en tampón TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA), cargando en cada pocillo 12 μ l de muestra amplificada. En todos los casos se incluyeron cepas control positivas y negativas. Alternativamente, se incluyó un marcador de pesos moleculares, el ADN del bacteriófago ϕ X174 cortado con *Hae*III (fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pares de bases) (Promega).

La electroforesis se realizó con fuentes y cubetas de electroforesis de Bio-Rad. El voltaje aplicado a los geles fue de 130 V durante 20-40 min, dependiendo del tamaño del gel. Los geles de agarosa se tiñeron en un baño con bromuro de etidio (10 μ g/ml) (Merck) y se observaron bajo luz ultravioleta (transiluminador modelo 2010 Macrovue, LKB).

Tabla 37. Primers utilizados en la PCR para la detección y caracterización de los distintos patotipos de *E. coli* diarreagénicos

Patotipo	Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación °C	Referencia
ECVT	<i>stx</i> ₁	VT1-F	TCGCTGAATGTCATTGCTCTGC	539	55	Mora <i>et al.</i> 2011b
		VT1-R	TCAGCAGTCATTACATAAGAAC			
ECVT	<i>stx</i> ₂	VT2-F1	TTTCTTCGGTATCCTATTCCC	358	55	Mora <i>et al.</i> 2011b
		VT2-F2	TGTCTTCAGCATCTTATGCAG			
		Vt2-R	CTGCTGTCCGTTGTCATGGAA			
ECVT	<i>subA</i>	SubHCDF	TATGGCTTCCCTCATTGC	556	64	Paton y Paton, 2005
		SubSCDR	TATAGCTGTTGCTTCTGACG			
ECVT	<i>stcE</i>	stcE-Fw	GGCTCCGGAGGTGGGGGAAT	399	64	Bustamante <i>et al.</i> 2011
		stcE-Rv	GAAGCCGGTGGAGGAACGGC			
ECVT	<i>E-hlyA</i>	hlyA-1	GGTGACAGAAAAAGTTGTAG	1551	60-62	Schmidt <i>et al.</i> 1995a
		hlyA-4	TCTCGCTGATAGTGTGGTA			
ECVT	<i>saa</i>	Saa-C	CAGATGCTGTACAGTTGGCCA	790	64-66	Paton y Paton, 2002
		Saa-DR	ATGGACATGCCTGTGGCAAC			
ECVT ECEP	<i>eae</i>	EAE-V3F	CATTGATCAGGATTTTCTGGT	510	55	Mora <i>et al.</i> 2011b
		EAE-MBR	TCCAGAATAATATTGTTATTACG			
ECEPt	<i>bfp</i>	EP1	AATGGTGCTTGCCTGTCTGC	326	55	Gunzburg <i>et al.</i> 1995
		EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
ECEI	<i>inv</i>	EI1	GCTGGAAAACTCAGTGCCT	424	55	Tornieporth <i>et al.</i> 1995
		EI2	CCAGTCCGTAATTCATTCT			
ECEA	pCDV432	pCVD432/start	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630	60	Schmidt <i>et al.</i> 1995b
		pCVD432/stop	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT			
ECEA	<i>aaiC</i>	<i>aaiC</i> -F	TGGTGACTACTTTGATGGACATTGT	313	62	Boisen <i>et al.</i> 2012
		<i>aaiC</i> -R	GACTACTCTTCTGGGGTAAACGA			
ECEA	<i>aggR</i>	<i>aggR</i> -F	GCAATCAGATTAARACGCGATACA	426	62	Boisen <i>et al.</i> 2012
		<i>aggR</i> -R	CATTCTTGATTGCATAAGGATCTGG			
ECET	<i>eltA</i>	LT-A-1	GGCGACAGATTATACCGTGC	696	55	Schultsz <i>et al.</i> 1994
		LT-A-2	CCGAATTCTGTTATATATGTC			
ECET	<i>est</i>	STa-A	ATTTTATTCTGTATTGTCTTT	176	48	Penteado <i>et al.</i> 2002
		STb-B	GGATTACAACACAGTTCACAGCAGT			

Tabla 38. Primers utilizados en la PCR para la detección y caracterización de los *E. coli* extraintestinales

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación °C	Referencia
<i>fimH</i>	fimH f	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	66	Johnson y Stell, 2000
	fimH r	GCACTCACCTGCCCTCCGGTA			
<i>fimAV</i> _{M178}	fimA201	TCTGGCTGATACTACACC	266	52	Marc y Dho-Moulin, 1996
	fimA215	ACTTTAGGATGAGTACTG			
<i>papEF</i>	PapEF f	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	64	Yamamoto <i>et al.</i> 1995
	PapEF r	AGAGAGGCCACTCTTATACGGACA			
<i>papG I</i>	Pap-I f	TTAGCTGGATGGCACAATG	335	54	Mora <i>et al.</i> 2013
	Pap-I r	TTGTCCATGTATCCCATTCT			
<i>papG II</i>	Pap-II f	GGCATTGCTACGGTAACCTG	545	54	Mora <i>et al.</i> 2013
	Pap-II r	CGCTATTAATAGACAGATCACC			
<i>papG III</i>	Pap-III f	CGGCAACTTTAAGCTATGTG	720	56	Mora <i>et al.</i> 2013
	Pap-III r	TGTACCATCTCATCGTTGTCTC			
<i>sfa/focDE</i>	sfa1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	64	Le Bouguenec <i>et al.</i> 1992
	sfa2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA			
<i>afa/draBC</i>	afa1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	750	58	Le Bouguenec <i>et al.</i> 1992
	afa2	CATCAAGCTGTTGTTCTCGCCCG			

Nombre del gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación °C	Referencia
<i>cnf1</i>	cnf1-f2	CAGGAGGTACTIONAGCAGCGT	468	50	Mora <i>et al.</i> 2013
	cnf1-rc	TAATTTGGGTTTGTATC			
<i>cdtB</i>	cdt-s1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	466	58	Tóth <i>et al.</i> 2003
	cdt-as1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA			
	cdt-s2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG			
	cdt-as2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA			
<i>sat</i>	SatF	GCAGCTACCGCAATAGGAGGT	937	58	Johnson <i>et al.</i> 2003b
	SatR	CATTACAGAGTACCGGGGCCTA			
<i>hlyA</i>	hly f	AACAAGGATAAGCACTGTCTGGCT	1177	58	Yamamoto <i>et al.</i> 1995
	hly r	ACCATATAAGCGGTTCATCCCGTCA			
<i>iucD</i>	Aer f	TACCGGATTGTATATGCAGACCGT	602	60	Yamamoto <i>et al.</i> 1995
	Aer r	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG			
<i>iroN</i>	Ironec-f	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	665	54	Johnson <i>et al.</i> 2000
	Ironec-r	GACGCCGACATTAAGACGCAG			
<i>kpsM II</i> ^a	KpsII f	GCGCATTGTCTGATACTGTTG	272	56	Johnson y Stell 2000
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA			
<i>kpsM II-K2</i> ^a	KpsII f	GCGCATTGTCTGATACTGTTG	570	56	Johnson y O'bryan, 2004
	KpsII-K2r	AGGTAGTTCAGACTCACACCT			
<i>kpsM II-K5</i> ^a	K5-f	CAGTATCAGCAATCGTTCTGTA	159	56	Johnson y Stell 2000
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA			
<i>neuC-K1</i> ^a	neu1	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	52	Moulin-Schouleur <i>et al.</i> 2006
	neu2	GGTGGTACATCCGGGATGTC			
<i>kpsM III</i>	KpsIII f	TCCTCTGCTACTATCCCCCT	392	56	Johnson y Stell 2000
	KpsIII r	AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC			
<i>cvaC</i>	ColV-Cf	CACACACAAACGGGAGCTGTT	680	55	Johnson y Stell 2000
	ColV-Cr	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT			
<i>iss</i>	is-f	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323	66	Rodríguez-Siek <i>et al.</i> 2005
	is-r	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA			
<i>traT</i>	TraT f	GGTGTGGTGCATGAGCACAG	290	66	Johnson y Stell 2000
	TraT r	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG			
<i>ibeA</i>	ibe10 f	AGGCAGGTGTGCGCCGCTAC	170	52	Johnson y Stell 2000
	ibe10 r	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC			
<i>malX (PAI)</i>	MALX-F	GCATGAGCAGTGCATACATCGC	828	56	Mora <i>et al.</i> 2013
	MALX-R	AGGCTGGGAAGTGGTTAGCC			
<i>usp</i>	usp-f	ACATTCACGGCAAGCCTCAG	440	66	Bauer <i>et al.</i> 2002
	usp-r	AGCGAGTTCCTGGTAAAAGC			
<i>iutA</i>	aer-851f	GGCTGGACATCATGGAACTGG	301	58-62	Johnson <i>et al.</i> 1997
	aer-1152r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
<i>tsh</i>	tsh03	GGTGGTGCCTGGAGTGG	640	64	Dozois <i>et al.</i> 2000
	tsh15	AGTCCAGCGTGATAGTGG			

^aVer Tabla 39

Tabla 39. Determinación del tipo de cápsula en base a los resultados de PCR para los genes *kpsM II*, *neuC-K1*, *kpsM II-K2* y *kpsM II-K5*

Tipo de cápsula	Genes			
	<i>kpsM II</i>	<i>neuC-K1</i>	<i>kpsM II-K2</i>	<i>kpsM II-K5</i>
<i>kpsM II-K1</i>	+	+	+	-
<i>kpsM II-K2</i>	+	-	+	-
<i>kpsM II-K5</i>	+	-	+	+

Tabla 40. Primers utilizados para la detección y tipificación de los distintos tipos y subtipos de intiminas

Variedades gen <i>eae</i>	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	T ³ de hibridación °C	Referencia
<i>eae</i> -α1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	820	60	Blanco J.E. et al. 2004
	EAE-A	CACTCTTCGCATCTTGAGCT			
<i>eae</i> -α2	IH2498aF	AGACCTTAGGTACATTAAGTAAGC	517	60	Blanco J.E. et al. 2004
	IH2498aR	TCCTGAGAAGAGGGTAATC			
<i>eae</i> -β1	B1F	CACAATTAATGCACCGGGT	241	55	Blanco M. et al. 2006b
	B1R	GCTTGATACACCTGATGACT			
<i>eae</i> -β2B	B2F	TGAAGGGGGGAACCCCTGTG	564	62	Blanco et al. 2006b
	B2R	TTTCTTTTGACTGTGCTAAAGC			
<i>eae</i> -δ/κ ^a	EAE-FN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	669	50	LREC, sin publicar
	EAE-DB	ATATGTCATCCGATTAAT			
<i>eae</i> -β3	42584F	AAGCGGATAACGCTGATACC	950	52	LREC, sin publicar
	EAE-RB2	ATATTTATTAGCAGCTCCCA			
<i>eae</i> -γ1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	804	60	Blanco J.E. et al. 2004
	EAE-C1	AGAACGCTGCTCACTAGATGTC			
<i>eae</i> -θ/γ2 ^a	EAE-C2F	AGAACGTTACTGGTCACTTA	414	58	Blanco et al. 2006b
	EAE-C2R	CTGATATTTTTATCAGCTTCA			
<i>eae</i> -ε1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	722	66	Blanco J.E. et al. 2004
	EAE-LP5	AGCTCACTCGTAGATGACGGCAAGCG			
<i>eae</i> -νR/ε2	EAE-E2F	AATACAGAAGTTAAGGCAT	378	58	Blanco et al. 2006b
	EAE-E2R	ACGACCACTATTCATTTTC			
<i>eae</i> -ε3	EAE-FN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	783	60	LREC, sin publicar
	31923R	CTCATAACGATTAGTGCC			
<i>eae</i> -ε4	37159F	GGCATAGAAGCTATTACC	951	50	LREC, sin publicar
	EAE-RB3	ATAACTATTGGCAGCGCCCA			
<i>eae</i> -ζ	Z1	GGTAAGCCGTTATCTGCC	206	68	Blanco J.E. et al. 2004
	Z2	ATAGCAAGTGGGGTGAAG			
<i>eae</i> -η1/η2	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	702	60	Blanco et al. 2006b
	ETA-B	TAAGCGACCACTATTCGTT			
<i>eae</i> -η1	ETA-FN	CGCTTTGTTTAAATGCCGATAAA	410	62	Blanco et al. 2006b
	ETA-RN	GACTGCGTAATGCACTG			
<i>eae</i> -η2	ETA2-F1	TGCTTTGTTTAAATCTGATAAG	410	52	LREC, sin publicar
	ETA2-R1	GGCTACGTAATGAACTA			
<i>eae</i> -ι1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	651	55	Blanco et al. 2006b
	IOTA-B	GTCATATTTAACTTTTACACTA			
<i>eae</i> -ι2	Iota2-F	CTGGTAAAGCGATAGTCAAAC	936	58	Blanco et al. 2006b
	Iota2-R	GCGTTTTTGAAGAAACATTTTGC			
<i>eae</i> -λ	68.4F	ATGTAACGTTTTTAAACACTGC	389	55	LREC, sin publicar
	68.4R	TACAACCTTAATAACAGCCTC			
<i>eae</i> -μB	EAE-FN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	710	58	LREC, sin publicar
	MICRA2	TGTGAGGATGGCAGAGAGCC			
<i>eae</i> -νB	IH1229aF	CACAGCTTACAATTGATAACA	311	60	Blanco J.E. et al. 2004
	IH1229aR	CTCACTATAAGTCATACGACT			
<i>eae</i> -ξB	EAE-FN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	739	64	LREC, sin publicar
	B49RN	ACTCATTCTGATAGCGGTAACCGG			
<i>eae</i> -ο	H2997fF	AGCGTTAGCAATGCCGAGTTGAT	271	60	Blanco et al. 2006b
	IH2997fR	CAACGGTAATTGTTGTTCC			
<i>eae</i> -π	1015F	GAACCTTTGGTAAGTTGGAT	479	55	LREC, sin publicar
	1015R	CAGCAGAGCTATAGATT			
<i>eae</i> -ρ	4794F	TAACAACAGGGAACGACGGACGC	302	66	LREC, sin publicar
	4794R	TAGTCTGTAGTTGACTCCACG			
<i>eae</i> -σ	Sigma-F	GCTCAAGCACAACTGCAAT	649	52	LREC, sin publicar
	Sigma-R	CTACATTAACATCAGAAC			
^b Primers empleados para la secuenciación de la región variable del gen <i>eae</i>	EAE-FBN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	1125	55	LREC, sin publicar
	EAE-R11	TCTTCGGAGGGTTTTTTATT			
	EAE-FBN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	1181	55	LREC, sin publicar
	EAE-R12	CCAGACGAATATATACATATTC			

^a Debido a que las secuencias nucleotídicas de las variedades (γ2 y θ) y (δ y κ) son casi idénticas (99% y 98% homología en la región variable, respectivamente), es necesario realizar su diferenciación mediante secuenciación ^b.

Tabla 41. Primers utilizados para la identificación de las distintas variedades de VT (EU-RL ,2013b).

Tipo y subtipo de VT	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación °C	Referencia
vt1a	Vtx1a-F1	CCTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478	62	Scheutz <i>et al.</i> 2012
	Vtx1a-R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG			
vt1c	Vtx1c-F1	CCTTCTGGTACAACCTGCGGTT	252	62	
	Vtx1c-R1	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA			
vt1d	Vtx1d-F1	CAGTAAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203	62	
	Vtx1d-R1	CTCTTCTCTGGTTCTAACCCCATGATA			
vt2f	F4	GGCACTGTCTGAAACTGCTCTGT	627	56	
	R1	ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC	625		
	F4-f	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT			
	R1-e/f	TAAACTCACCTGGGCAAAGCC			
vt2a	Vtx2a-F2	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	349	62	
	Vtx2a-R3	CCGKCAACCTTCACTGTAATGTG			
	Vtx2a-R2	GGCCACCTTCACTGTGAATGTG			
vt2b	Vtx2b-F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	251	62	
	Vtx2b-R1	CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
vt2c	Vtx2c-F1	GAAAGTCACAGTTTTATATACAACGGGTA	177	62	
	Vtx2c-R2	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA			
vt2d	Vtx2d-F1	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	179	62	
	Vtx2d-R1	TYCCGGCCACTTTTACTGTG			
	Vtx2d-R2	GCCTGATGCACAGGTACTGGAC			
	Vtx2d-O55-R	TCAACCGAGCACTTTGCACTAG			
vt2e	Vtx2e-F1	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	411	62	
	Vtx2e-R2	CTTCTGACACCTTCACAGTAAAGGT			
vt2f	Vtx2f-F1	TGGCGTCATTCACTGGTTG	424	62	
	Vtx2f-R1	TAATGGCCGCCCTGTCTCC			
vt2g	Vtx2g-F1	CACCGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573	62	
	Vtx2g-R1	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT			

Tabla 42. Primers utilizados para la detección y tipificación de *E. coli* productoras de BLEE

Gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación °C	Referencia
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-C3	ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATG	542	58	Mora <i>et al.</i> 2013
	CTX-C4	ACCGCGATATCGTTGGTGGTGCC			
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	863	52	Saladin <i>et al.</i> 2002
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	^b CTX-15-F1	GAAGCTAATAAAAAACACAGTGG	1044-1123	52	Mora <i>et al.</i> 2013
	^b CTX-15-R	GTATGCGCAAGCGCAGGTGG			
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	^a CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856	56	Simarro <i>et al.</i> 2000
	^a CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	^b CTX-M9-14-14B-24F	GAATACTGATGTAACACGGA	998	44	LREC, sin publicar
	^b CTX-M9-R	AGCTGAAGATGTATATCAAG			
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	^b CTX-M9-14-14B-24-F	GAATACTGATGTAACACGGA	989	52	LREC, sin publicar
	^b CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	^b CTX-M9-14B-F	CCTATACCCGAGGCGCGACAG	1059	44	LREC, sin publicar
	^b CTX-M9-R	AGCTGAAGATGTATATCAAG			
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	^b CTX-M14-24-F	CTAAATTCCTCGTAAATAGTG	1049	44	LREC, sin publicar
	^b CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
<i>bla</i> _{CTX-M-15 extremo 3'}	CTX-M-F1	ATAAAACCGGCAGCGGTG	483	55	Leflon-Guibout <i>et al.</i> 2004
	CTX-M-F2	GAATTTTGACGATCGGGG			
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F2	TTGTCGCTTCTTACTCGCC	879	58	Mora <i>et al.</i> 2013
	SHV-R2	CCGGCCGATTTGCTGATTTCCG			
<i>bla</i> _{SHV}	^b SHV-1	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	930	48	Rasheed <i>et al.</i> 1997
	^b SHV-2	TTAGCGTTGCCAGTGCTC			
<i>bla</i> _{TEM}	^a TEM-1-F	ATGAGTATCAACATTTCCG	868	50	Rasheed <i>et al.</i> 1997
	^a TEM-1-R	CTGACAGTTACCAATGCTTA			

^aPrimers utilizados para PCR y secuenciación

^bPrimers utilizados para la secuenciación

Tabla 43. Primers utilizados para la tipificación del antígeno O

Gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación °C	Referencia	
<i>rfbO25b</i>	<i>rfb.1bis.f</i>	ATACCGACGACGCCGATCTG	300	55	Clermont <i>et al.</i> 2008	
	<i>rfbO25b.r</i>	TGCTATTCATTATGCGCAGC				
<i>wzx-O26</i>	O26F	TTTTATCTGGCGTGCTATCG	247	58	Lin <i>et al.</i> 2011	
	O26R	CGGGGTTGCTATAGACTGAA				
<i>wzy-O45</i>	<i>wzy-O45-F</i>	TACGATTTACAAGCTTCCA	254	48		
	<i>wzy-O45-R</i>	TGCAATCGCATAAGGAAATA				
<i>wzx-O91</i>	<i>wzx-O91-F</i>	CATGCTGCTCATTCTTCTCA	134	58		
	<i>wzx-O91-R</i>	TGGAGTTTGAACAACAAAA				
<i>wzx-O103</i>	<i>wzx-O103-F</i>	GGGCTTGATTGTTGTACCG	169	58		
	<i>wzx-O103-R</i>	AGTGGCAAACAGCCAACACTAC				
<i>wzx-O104</i>	<i>wzx-O104-F</i>	CGTTTAGCCGGAAATGAGAA	630	58		Mora <i>et al.</i> 2011b
	<i>wzx-O104-R</i>	TGAAACGACACCACTTATTGC				
<i>wzx-O111</i>	<i>wzx-O111-F</i>	CAATCCAATTTGCATCTTCA	239	48		Lin <i>et al.</i> 2011
	<i>wzx-O111-R</i>	ACCGCAAATGCGATAATAAC				
<i>wzy-O121</i>	<i>wzy-O121-F</i>	TGGATGGCATTCTCAGTAT	254	58		
	<i>wzy-O121-R</i>	AGCAAGCCAAAACACTCAAC				
<i>wzy-O145</i>	<i>wzy-O145-F</i>	GTTCCTGTCTGTTGCTTCA	291	58		
	<i>wzy-O145-R</i>	ATCGCTGAATAAGCACCACT				
<i>wzx-O146</i>	<i>wzx-O146-F</i>	AGGGTGACCATCAACACACTTGGGA	640	48	Liu <i>et al.</i> 2007	
	<i>wzx-O146-R</i>	AGTTCAATACTGTGCGAGCTCCTC				
<i>O157 rfbE</i>	O157-AF	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG	497	55	Desmarchelier <i>et al.</i> 1998	
	O157-AR	CATTGGCATCGTGTGGACAG				

Tabla 44. Primers utilizados para la tipificación del antígeno H

Gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación °C	Referencia
<i>fliC_{h4}</i>	<i>flic-H4-F</i>	GCAGCGTATTCGTGAACCTGA	713	66	Mora <i>et al.</i> 2011b
	<i>flic-H4-R</i>	GCTGGATAATCTGCGCTTTC			
<i>fliC_{h7}</i>	<i>flicH7-F</i>	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625	55	Gannon <i>et al.</i> 1997
	<i>flicH7-R</i>	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC			
<i>fliC_{h11}</i>	<i>flicRH11-1</i>	ACTGTTAACGTAGATAGC	248	54	Durso <i>et al.</i> 2005
	<i>flicRH11-2</i>	TCAATTTCTGCAGAATATAC			
<i>fliC_{h19}</i>	<i>flic-H19-F</i>	AATGACCATCACTTCTGC	338	58	LREC, sin publicar
	<i>flic-H10-R</i>	GGTCTGTGATTGCGCCGC			
<i>fliC_{h21}</i>	H21-F	GGCGATTGCTAACCGTTTTA	549-556	58	LREC, sin publicar
	H21-R	CGTAAGTGAACCATCCGCAG			

La determinación de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Clermont y colaboradores (2000) (Tabla 46). Utilizando para ello, los primers citados en la Tabla 45.

Tabla 45. Primers utilizados para la identificación de los grupos filogenéticos

Gen/fragmento de ADN	Primer	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación °C	Referencia
<i>chuA</i>	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	62	Clermont <i>et al.</i> 2000
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>yjaA</i>	YjaA.1	TGAAGTGTGAGGAGAGCTG	211	54	
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCTCAAC			
TSPE4.C2	TspE4.C2.1	GAGTAATGTGCGGGCATTCA	152	54	
	TspE4.C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			

Tabla 46. Grupo filogenético asignado en base a los resultados de PCR para los genes *chuA* y *yjaA*, y el fragmento TSPE4.C2

Grupo filogenético	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A	-	+ / -	-
B1	-	+ / -	+
B2	+	+	+ / -
D	+	-	+ / -

3.4.3. Secuenciación

La secuenciación de fragmentos de ADN se empleó para el tipado de las enzimas producidas por las cepas BLEE y de algunas intiminas, así como para el clonotipado. Se llevó a cabo en la “Plataforma de Secuenciación e Xenómica Funcional” del departamento de Xenética de la Facultad de Veterinaria del campus de Lugo (USC), mediante el método Sanger. El equipo empleado con este fin fue un analizador genético ABI 3100 (Applied Biosystems) con los reactivos BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit. Los primers utilizados para la secuenciación se listan en la Tabla 40, Tabla 42 y Tabla 47.

3.4.4. PCR en tiempo Real (RT-PCR)

La PCR en tiempo real (RT-PCR) o PCR cuantitativa (qPCR) es una modificación de la PCR convencional que se utiliza para amplificar y detectar una región específica de ADN y cuantificar los productos resultantes al mismo tiempo que se desarrolla la reacción. Esto es posible gracias a que los termocicladores diseñados para RT-PCR, incorporan un lector de fluorescencia que permite conocer la cantidad de ADN sintetizado en el mismo momento en que la muestra emite la señal fluorescente, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de copias de ADN formado (Fonseca *et al.* 2010).

La fluorescencia evaluada es la que se produce durante la fase de crecimiento exponencial y el ciclo de PCR en el que se produce se denomina Ct (Threshold cycle) (Figura 24). Este valor está relacionado con la cantidad de ADN de partida y será menor cuanto mayor sea la señal de fluorescencia, es decir, cuantas más copias haya del ADN diana.

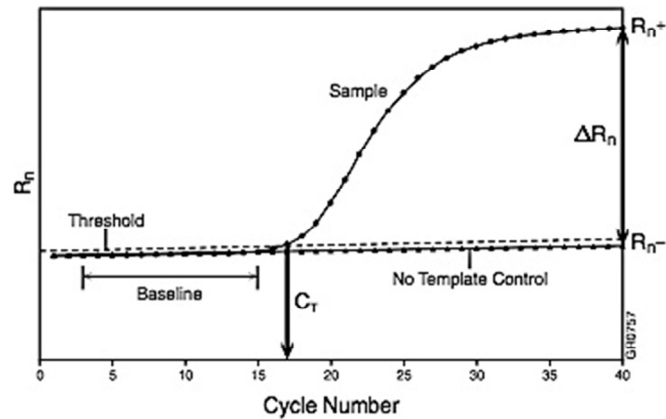


Figura 24. Esquema de una curva de amplificación en una reacción de RT-PCR (Applied Biosystems – Relative Quantification Getting Started Guide for 7000 v1.1.27)

Los ensayos en los que se analizan secuencias específicas mediante RT-PCR, usan sondas marcadas con fluorocromos. Para la realización de este trabajo se ha utilizado la sonda de hidrólisis TaqMan®, que es un oligonucleótido marcado con dos fluorocromos en sus extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de la secuencia de ADN diana.

El fluorocromo donador está situado en el extremo 5' y se llama "reporter" y el fluorocromo aceptor del extremo 3' recibe el nombre de "quencher". Cuando la sonda está intacta, la proximidad entre donador y aceptor provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente) que se traduce en que el fluorocromo aceptor inhibe la emisión de fluorescencia del donador.

En el transcurso de la reacción, la sonda se une a su secuencia diana cuando ésta se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa provoca la liberación del fluorocromo donador del extremo 5' de la sonda y al separarse del aceptor comienza a emitir fluorescencia (Figura 25).

Cuanto mayor es la cantidad de producto generado, mayor es la cantidad de sondas que hibridan en la secuencia diana y que liberan fluorocromo donador durante la reacción, por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de amplicón generado.

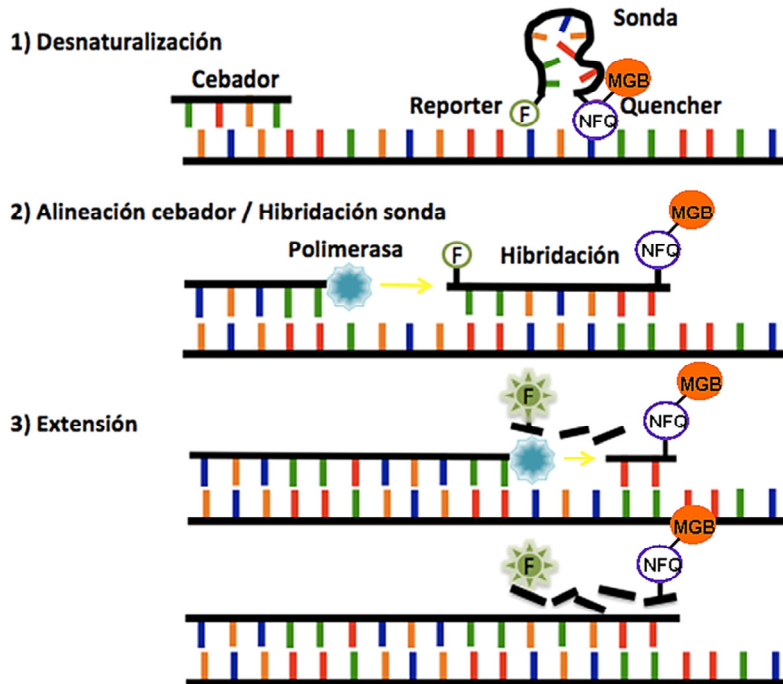


Figura 25. El donador y el aceptor están unidos en la sonda y no hay emisión de fluorescencia. La enzima Taq polimerasa corta la sonda fluorescente durante cada ciclo de amplificación, aumentando la emisión de fluorescencia al liberar el donador (Figura adaptada de Guarddon, 2013)

VENTAJAS DE LA PCR EN TIEMPO REAL

La RT-PCR, además de proporcionar información cuantitativa, como ya se ha comentado anteriormente, presenta otra serie de ventajas frente a la PCR convencional (www.lifetechnologies.com):

- Es una técnica más rápida, ya que durante la reacción solo emplea dos etapas por ciclo, mientras que la PCR convencional necesita tres. Esto es debido al pequeño tamaño de los amplicones (entre 50 y 150 pb), de manera que el tiempo invertido en pasar entre las fases de unión de los primers y de desnaturalización es suficiente para copiar la secuencia diana. Además, la RT-PCR emplea el Ct como medida fiable del número de copias inicial de ADN diana en la muestra, en lugar de medir el producto acumulado a tiempo final.
- El hecho de que los amplicones sean tan pequeños confiere al ensayo una mayor eficiencia, ya que permite detectar el ADN diana incluso en muestras muy degradadas.
- No requiere elaboración, tinción y visualización de geles de agarosa, lo que también la

convierte en una técnica más segura que la PCR tradicional y reduce el riesgo de contaminación de la muestra.

- Es una técnica muy específica debido a la incorporación de un tercer oligonucleótido, la sonda marcada con los fluorocromos.

En el presente estudio se evaluaron dos kits comerciales distintos:

- VT1 VT2 VTEC Screening Assay (Applied Biosystems/Life Technologies).
- TaqVet™ Pathogenic *E. coli* Screening (Laboratoire Service International), para la detección de los factores de virulencia de *vt1*, *vt2* y *eae* en muestras de alimentos.

Ambos basados en las sondas TaqMan®-MGB, que incluyen una molécula llamada MGB (Minor Groove Binder) que se une al surco menor del ADN y que otorga a la sonda una mayor estabilidad y especificidad durante la hibridación a la secuencia diana. También utilizan un “quencher” no fluorescente (NFQ) que actúa como un aceptor de transferencia de energía del donador, pero que no emite una señal fluorescente detectable por sí misma. Esto permite obtener una señal más limpia que facilita la interpretación de los datos.

3.4.4.1. VT1 VT2 VTEC Screening Assay (Applied Biosystems/Life Technologies)

CONTROLES Y REACTIVOS

Los reactivos y controles utilizados con el kit de Applied Biosystems para RT-PCR son los siguientes:

- TaqMan® Environmental Master MIX 2.0: incluye ApliTaq Gold® DNA Polimerasa y una referencia interna pasiva.
- TaqMan®VT1 (*stx1*)/IPC Assay: incluye primers para *vt1* y sonda Taqman® marcada con FAM™-MGB; y primers IPC y sonda Taqman® VIC®-MGB.
- TaqMan®VT2 (*stx2*)/IPC Assay: incluye primers para *vt2* y sonda Taqman® marcada con FAM™-MGB, y primers IPC y sonda Taqman® VIC®-MGB.
- Control Positivo Interno (IPC): se trata de un ADN molde sintético que se

añade a las reacciones de PCR para distinguir los resultados negativos verdaderos de las inhibiciones de la PCR.

- Control Negativo (NC): se añade a un pocillo por mezcla, y se trata de agua o tampón que no debe producir ninguna amplificación.

EXTRACCIÓN DEL ADN

- Utilizamos un kit de extracción (PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit) a partir de las muestras de alimentos incubadas 18-24 h en APT.
- Insertar la columna en el tubo eppendorf e inocular 750 µl de muestra en la columna.
- Centrifugar 3 min a velocidad máxima.
- Descartar la columna y el sobrenadante.
- Preparar una mezcla de Buffer de lisis (50 µl por muestra) + proteinasa K (5 µl por muestra).
- Añadir al pellet 55 µl de la mezcla anterior, agitar en vortex para resuspender el pellet.
- Incubar a 95 °C 10 min y dejar enfriar 2 min a Tª ambiente.
- Centrifugar 1 min a máxima velocidad.
- Añadir 250 µl de agua bidestilada estéril. Agitar para resuspender de nuevo el pellet.
- Centrifugar 1 min a máxima velocidad.

MEZCLAS DE REACCIÓN

En tubos independientes, se preparan las mezclas para VT1 y VT2 según el número de muestras:

- TaqMan® Environmental Master MIX 2.0= 15 µl por muestra.
- TaqMan®VT1 (*stx1*)/IPC Assay, TaqMan®VT2 (*stx2*)/IPC Assay= 3 µl por muestra, respectivamente.
- Dispensar en cada pocillo de la placa (volumen total de reacción 30µl):
 - 18 µl de mezcla de reacción.
 - 12 µl de ADN extraído o de NC para los pocillos control.

FLUOROCROMOS

Las sondas TaqMan® incluidas, portan los siguientes fluorocromos:

	VT1/VT2		IPC	
TaqMan® VT1 (stx1) Assay	Reporter	FAM™	Reporter	VIC®
TaqMan® VT2 (stx2) Assay	Quencher	NFQ-MGB	Quencher	NFQ-MGB

AMPLIFICACIÓN

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems).

Las mezclas de reacción fueron sometidas a:

- 1 ciclo de activación enzimática y desnaturalización (95°C/10 min).
- 45 ciclos de amplificación (95 °C/15 s, 60 °C 45 s).

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para el análisis de los resultados se utilizó el software StepOne versión 2.1 de Applied Biosystems. Para la validación, se tuvieron en cuenta los datos obtenidos para los controles (IPC y control negativo):

MUESTRAS			CONTROLES NEGATIVOS		
Diana	IPC	Resultado	Diana	IPC	Resultado
Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	OK
Negativo	Negativo	Inhibición	Positivo	Positivo o Negativo	Contaminación
Positivo	Positivo o Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Fallo de la prueba

3.4.4.2. TaqVet Pathogenic™ *E. coli* Screening (Laboratoire Service International)

CONTROLES Y REACTIVOS

Los reactivos y controles utilizados con el kit de LSI para RT-PCR son los siguientes:

- Mix *stx1/aeae*: incluye primers para *vt1* y sonda TaqMan® marcada con FAM™-MGB, y primers *aeae* y sonda TaqMan VIC®-MGB.
- Mix *stx2/IPC*: incluye primers para *vt2* y sonda TaqMan® marcada con FAM™-MGB, y primers IPC y sonda TaqMan VIC®-Tamra.
- Control Positivo Interno (IPC)
- Control positivo Externo (EPC): contiene amplicones de *vt1*, *vt2* y *aeae*.

Además el fabricante recomienda utilizar dos tipos de controles negativos:

- Control Negativo (NC): 25 µl de *Mix sxt1/ea* en un pocillo de la placa de amplificación y *Mix sxt2/IPC* en otro pocillo. Un resultado negativo indica que no ha habido contaminación durante la preparación de la mezcla.
- Control de muestra negativa (NCS): agua libre de DNasa y RNasa extraída como una muestra. Un resultado negativo indica que no ha habido contaminación durante la extracción y la amplificación de las muestras.

EXTRACCIÓN DEL ADN

- Utilizamos un kit de extracción (QIAamp® DNA mini kit, Qiagen) a partir de las muestras de alimentos incubadas 18-24 h en APT.
- Transferimos 1 ml del caldo de enriquecimiento a un tubo eppendorf. Centrifugamos a 5000 g/5 min.
- Descartamos el sobrenadante y añadimos al pellet:
 - 200 µl de buffer de lisis (AL).
 - 20 µl de proteinasa K.
 - 5 µl de IPC.
- Para el NCS, añadir en un tubo eppendorf:
 - 200 µl de AL buffer.
 - 20 µl de proteinasa K.
 - 5 µl de IPC.
 - 200 µl de Agua libre de DNasa y RNasa
- Vortex 1 min.
- Incubar a 70 °C/30 min.
- Esperar hasta enfriar, después añadir 200 µl de etanol 100%. Vortex 15 s.
- Transferir el contenido de los tubos eppendorf a columnas debidamente identificadas. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min (15.000 a 20.000 g). Descartar el tubo y conservar la columna.

- Añadir 500 μl de buffer de lavado (AW1). Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min. Descartar el tubo y conservar la columna.
- Añadir 500 μl de buffer de lavado (AW2). Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min. Descartar el tubo y conservar la columna.
- Centrifugar a máxima velocidad 3 min (secado de la membrana).
- Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1,5 ml y añadir 200 μl de buffer de elución (AE) para extraer el ADN. Incubar 1 min a Tª ambiente y centrifugar a máxima velocidad durante 1 min.

MEZCLAS DE REACCIÓN

En tubos independientes, se preparan las mezclas según el número de muestras:

- Mix *stx1/eae*: 20 μl para cada muestra.
- Mix *stx2/IPC*: 20 μl para cada muestra.
- Volumen total de la muestra 25 μl (20 μl de master mix + 5 μl de ADN extraído o de NCS para los pocillos control).

FLUOROCROMO

Las sondas TaqMan® incluidas portan los siguientes fluorocromos:

	Reporter	Quencher
<i>E. coli vt1</i>	FAM™	NFQ-MGB
<i>E. coli eae</i>	VIC®	NFQ-MGB
<i>E. coli stx2</i>	FAM™	NFQ-MGB
<i>E. coli IPC</i>	VIC®	Tamra

AMPLIFICACIÓN

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems).

Las mezclas de reacción fueron sometidas a:

- 1 ciclo de (50 °C/2 min).
- 1 ciclo de (95 °C/10 min).
- 40 ciclos de amplificación (95 °C/15 s, 60 °C/1 min).

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para el análisis de los resultados se utilizó el software StepOne versión 2.1 de Applied Biosystems. Para su validación se tuvieron en cuenta los datos obtenidos para los controles (IPC y controles negativos).

3.5. Identificación y caracterización fenotípica

3.5.1. Identificación y sensibilidad antimicrobiana

La identificación fenotípica de las cepas y el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos se realizó en la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) mediante el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 Plus (Siemens Healthcare Diagnostics, CA, USA), utilizando los paneles para bacilos gram negativos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los antibióticos incluidos en los paneles para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron los siguientes: penicilinas (ampicilina); cefalosporinas, incluidas de espectro extendido (cefalotina, cefazolina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima y cefepima); inhibidores de β -lactamasas (amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam); cefamicinas (cefoxitina); carbapenemas (imipenem); aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina); quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina); trimetoprim-sulfametoxazol y fosfomicina.

Las CMI para cada antimicrobiano se determinaron en base a los estándares establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI, 2013). Valores de sensibilidad intermedios, no fueron considerados como resistencia.

Para detectar/confirmar la producción de BLEE se utilizó la prueba de sinergia (Jarlier *et al.* 1988) (Figura 26), empleando las cefalosporinas de 3ª generación (cefotaxima o ceftazidima) y como inhibidor de β -lactamasas la amoxicilina/ácido clavulánico.

El tipado de BLEE de las cepas positivas se llevó a cabo según se especifica en el apartado 3.4.3 (página 128) y la Tabla 42.



Figura 26. Detección de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante la prueba de sinergia. Una diferencia igual o superior a 5 mm en el diámetro de halo de uno de los antibióticos con clavulánico, comparado con el halo del mismo antibiótico sin clavulánico, sería indicativo de producción de BLEE. CPD10=cefepodoxima, CD01=cefepodoxima-ácido clavulánico (10 μ g), CAZ=ceftazidima, CD02=ceftazidima-ácido clavulánico (10 μ g), CD03=cefotaxima-ácido clavulánico (10 μ g), CTX30=cefotaxima (De Cueto, 2005)

3.5.2. Serotipado

La determinación del antígeno O y H de las cepas fue realizada siguiendo la metodología originalmente descrita por Guinée y colaboradores (1981).

3.5.2.1. Determinación del antígeno O

La determinación del antígeno O de las cepas se llevó a cabo mediante la técnica de microaglutinación. Para ello se emplearon los 173 antisueros O capaces de reaccionar específicamente con los antígenos O1 a O181 de *E. coli*. Estos antisueros se obtienen en el LREC mediante inmunización de conejos con las cepas de referencia correspondientes. Los sueros extraídos de los animales se absorben para eliminar reacciones cruzadas. Además de los antisueros O monovalentes, se dispone de 24 antisueros O polivalentes (A–X) formados por 6 o 7 de los antisueros monovalentes, en los que la dilución final de los antisueros individuales en el polivalente coincide con la dilución de ensayo (1/40 o 1/80).

PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES BACTERIANAS

- Cultivar las cepas problema en TSA e incubar (37 °C/18 h).
- Suspender el crecimiento que hemos obtenido en TSA en 2 ml de solución salina (0,85% ClNa, p/v) y ajustar la concentración bacteriana (1,8 x 10⁹ bacterias/ml) por comparación con el tubo número 6 de la escala McFarland.
- Calentar las suspensiones a 100 °C/1 h en un baño de agua, para destruir el antígeno K

en el caso de que la cepa posea cápsula y desenmascarar el antígeno O.

- Una vez enfriadas las suspensiones, añadir a cada tubo 2 ml de solución salina formalinizada (0,5%, v/v) con violeta de genciana (0,005%, p/v). Conservar las suspensiones bacterianas a 4 °C durante un máximo de 2 semanas.
- Algunas cepas de los serogrupos O8, O9, O20 y O101 se caracterizan por tener una variedad de antígeno K que es termorresistente, que necesita una exposición a 121 °C/2,5 h para su inactivación. Por ello, si la cepa problema da un resultado negativo después de enfrentarla con todos los antisueros, se preparará una segunda suspensión que se autoclavará a 121 °C/2,5 h para enfrentarla con los antisueros O8, O9, O20 y O101.

DETERMINACIÓN PRESUNTIVA DEL SEROGRUPO O

- Enfrentar las suspensiones calentadas a 100 °C/1 h con los 24 antisueros polivalentes y las tratadas a 121 °C/2,5 h con los antisueros monovalentes O8, O9, O20 y O101 a la dilución de ensayo. Para ello, añadir a 50 µl de cada antisuero 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida. Tapar la placa e incubar (37 °C/18 h).
- Si la cepa bacteriana da aglutinación con alguno de los antisueros polivalentes empleados, se realiza a continuación el mismo proceso con los antisueros O monovalentes incluidos en el suero polivalente correspondiente. Realizar la confirmación del serogrupo O con las cepas que hayan sido aglutinadas por uno o más antisueros O monovalentes. Si la cepa es negativa con todos los antisueros se considera no tipable (ONT).

En los pocillos positivos, la aglutinación provoca la formación de una película que impide la sedimentación de las bacterias. En los pocillos negativos, las bacterias sedimentan dando lugar a la formación de unos acúmulos de bacterias que se visualizan en forma de botones azulados (Figura 27).

CONFIRMACIÓN DEL SEROGRUPO O

La determinación del antígeno O se completa con la confirmación del antígeno mediante titulación, según se describe a continuación:

- Colocar 50 μ l de solución salina en todos los pocillos de cada fila, excepto en el nº1.
- Añadir a los pocillos nº 1 y nº 2 de cada fila 50 μ l de la dilución de ensayo del antisuero O correspondiente. Hacer diluciones seriadas (1:2), transfiriendo 50 μ l de la mezcla del pocillo nº 2 al nº 3, mezclando y repitiendo la operación hasta llegar al pocillo nº 10. Utilizar los pocillos 11 y 12 como controles negativos, desechando los 50 μ l que sobran después de mezclar en el pocillo nº 10.
- Añadir 50 μ l de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida a los 12 pocillos de cada fila, empezando por el nº 12 y avanzando hasta el nº 1. Tapar las placas e incubar (37 °C/18 h) y realizar la lectura de los resultados determinando los títulos.

El título será la máxima dilución del antisuero O que impide la sedimentación de las bacterias (Figura 27).

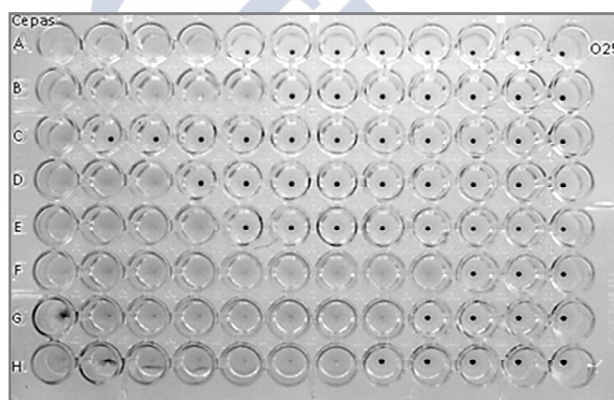


Figura 27. Titulación del antígeno O y titulación

3.5.2.2. Determinación del antígeno H

La determinación del antígeno H de las cepas se llevó a cabo mediante la técnica de aglutinación en tubo. Para ello se emplearon 53 antisueros (H1 a H56). Estos antisueros se obtienen en el LREC mediante inmunización de conejos con las cepas de referencia correspondientes. Los sueros extraídos de los animales se absorben para eliminar reacciones cruzadas. Además de los antisueros H monovalentes, se dispone de 9 antisueros H polivalentes formados por 5 o 6 de los antisueros monovalentes, en los que la dilución final de los antisueros individuales en el polivalente coincide con la dilución de ensayo (1/200).

EXPRESIÓN FLAGELAR Y MOVILIDAD

- Cultivar las cepas problema en TSA e incubar (37 °C/18 h).
- Dar a las cepas 3 pases consecutivos (37 °C/48 h) en tubos en forma de "U" con 5 ml de medio para movilidad (medio semisólido MIL, Difco), con objeto de potenciar la expresión de los flagelos. Para ello se siembra por picadura uno de los extremos del tubo. Si la cepa es móvil y ha alcanzado el extremo opuesto del tubo en "U", continuar el protocolo en el siguiente punto; si la cepa no ha alcanzado el extremo opuesto o no ha expresado movilidad, continuar dando pases hasta completar 6. Si completados los 6 pases, la cepa continúa siendo inmóvil, se considerará cepa no móvil (HNM).
- Del tubo en "U", recoger crecimiento bacteriano del extremo opuesto al sembrado inicialmente y transferir a 7 ml de infusión de cerebro-corazón (Difco) e incubar (37 °C/6-8 h/80 rpm).
- Añadir a los cultivos obtenidos, 7 ml de solución salina (0,85%, p/v) formalinizada (0,5%, v/v) y dejar los tubos a temperatura ambiente una noche. La turbidez de los tubos tratados con solución salina formalinizada debe ser comparable a la del tubo nº 2 de la escala de McFarland ($6,0 \times 10^8$ bacterias/ml).

DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO H

- Utilizar 10 tubos de vidrio tipo Kahn para cada cepa problema. Dispensar 500 µl de cada uno de los 9 antisueros H polivalentes diluidos a 1/200 en los 9 primeros tubos, y 500 µl de solución salina (0,85%, p/v) en el décimo tubo que servirá como control negativo. A continuación, añadir 500 µl de la suspensión bacteriana formalinizada obtenida en el apartado anterior, e incubar en baño de agua (45 °C/2 h).
- Realizar la lectura de los resultados. La aglutinación se traduce en la formación de una película en el fondo del tubo, con el sobrenadante transparente. En los cultivos negativos para el polivalente con el que se ha enfrentado, la falta de aglutinación supone que el sobrenadante continua turbio con una turbidez equivalente al tubo de control negativo (Figura 28). Si no hay aglutinación con ninguno de los antisueros polivalentes, se considera que tiene un antígeno H no tipable (HNT).
- Si hay reacción positiva con alguno de los antisueros polivalentes, enfrentar la

suspensión bacteriana con los antisueros monovalentes incluidos en el mismo. Para ello, dispensar 500 µl de cada antisuero H monovalente en tubos tipo Kahn y a continuación, añadir 500 µl de la suspensión bacteriana problema a cada uno de ellos. El tubo en el que se observe una reacción aglutinante nos indicará el antígeno H de la cepa problema.

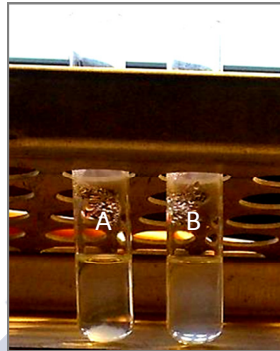


Figura 28. Determinación del antígeno H. A) Tubo Kahn con aglutinación (reacción⁺). B) Control negativo

3.6. Definición de relaciones clonales y análisis de similitud

Una vez realizada la caracterización fenotípica y genotípica, se analizó la similitud de las cepas aisladas de alimentos con respecto a las de otros orígenes, aisladas de otros estudios y pertenecientes a la colección del LREC. Con este fin se emplearon las herramientas de tipado molecular: clonotipado y electroforesis en campo pulsado.

3.6.1. Clonotipado

Weissman y colaboradores (2012) diseñaron una nueva herramienta de genotipado de gran utilidad en los análisis epidemiológicos moleculares. Se trata de un esquema denominado clonotipado (CH), que se basa en la secuenciación de dos loci (*fumC*/*fimH*). En concreto, se analiza un fragmento interno de 489 nucleótidos de *fimH* (gen que codifica para la adhesina fimbrial tipo 1) y un fragmento interno de 469 nucleótidos de uno de los genes altamente conservados (*fumC*) utilizado en el esquema de tipado de MLST (Multilocus Sequence Typing) (Tabla 47).

Tabla 47. Loci y primers utilizados en el clonotipado

Gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación °C	Referencia
<i>fimH</i>	fimH-F	CACTCAGGGAACCATTCAGGCA	975	54	Weissman <i>et al.</i> 2012
	fimH-R	CTTATTGATAAACAAAAGTCAC			
<i>fumC</i>	fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	56	* http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli
	fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTC			

*MLST Dabatase from the Achtman scheme <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi.html>

3.6.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

La técnica de PFGE es una herramienta de subtipado molecular con un poder de discriminación superior a los métodos de ribotipado y MLST. Es un método de referencia para muchas redes/organizaciones mundiales (PulseNet, FoodNet, EU-RL VTEC) especialmente, en estudios epidemiológicos locales en los que interesa detectar cepas implicadas en brotes y sus fuentes de origen.

Esta técnica se basa en el análisis de perfiles de macrorrestricción obtenidos con enzimas de restricción (en nuestro caso *Xba*I), que cortan de manera infrecuente el ADN cromosómico para generar grandes fragmentos de ADN (mayores de 40 kb), que no se podrían separar mediante electroforesis convencional, por lo que, para conseguirlo se alterna cíclicamente la orientación del campo eléctrico durante el proceso electroforético (PFGE) (Figura 29).

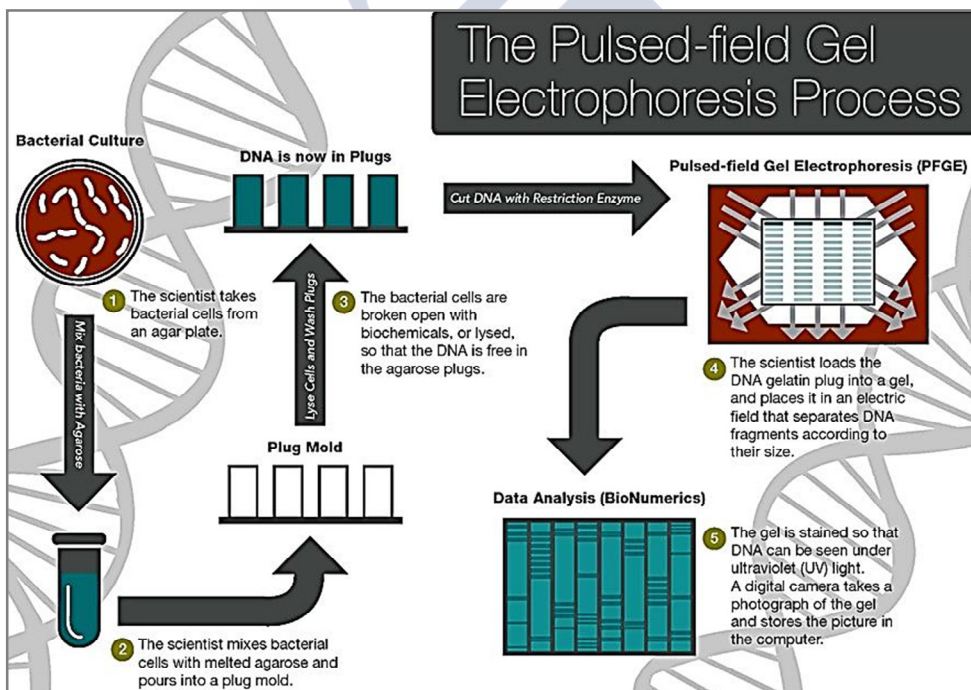


Figura 29. Esquema de la técnica de PFGE (<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html#pfge>)

Para el análisis de los perfiles de macrorrestricción obtenidos con *Xba*I se utilizó el programa BioNumerics version 5.0. (Applied Maths, Sint-Martens-Latem) empleando el índice estadístico Dice, basado en el método de UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) para la construcción de dendrogramas que reflejan la

distribución de las cepas en clusters con más de un 85% de homología (cepas clonalmente relacionadas, con seis o menos bandas de diferencia).

La técnica de PFGE se llevó a cabo en un equipo CHEF MAPPER (Bio-Rad) de acuerdo con el protocolo estandarizado de PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>) con pequeñas modificaciones. Brevemente:

LISIS CELULAR

- Suspensión en 2 ml de CSB (100 mM Tris: 100 mM EDTA; pH 8) de las cepas bacterianas crecidas en TSA 18-24 h a 37 °C.
- Medir absorbancia a 420 nm.
- Preparar 400 µl de la suspensión a una concentración de 0,9 (ajustar con CSB).
- Añadir a cada suspensión 20 µl de proteinasa K (de una concentración de 20 mg/ml).
- Mezclar los 400 µl de la suspensión bacteriana anterior con 400 µl de agarosa al 1%, previamente atemperada a 55 °C (agarosa para bloques = 0,50 g de agarosa SeakemGold, 45 ml de buffer TE [10 mM Tris: 1 mM EDTA; pH 8], 5 ml de SDS 10%) y preparar los bloques (2 bloques por muestra). Dejar solidificar unos 15 min a temperatura ambiente o 5 min a 4 °C.
- En tubos de 10 ml añadir 5 ml de buffer de lisis (50 mM Tris: 50 mM EDTA + 1% Sarkosyl; pH8) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Depositar los bloques en los tubos correspondientes.
- Incubar 3 h a 55 °C en agitación.
- Retirar el buffer de lisis. Lavar con 5 ml de agua bidestilada previamente atemperada a 50 °C, 20 min en agitación a 50 °C.
- Realizar otro lavado con agua en las mismas condiciones.
- Retirar el agua y realizar tres lavados con 5 ml de buffer TE (10 mM Tris: 1 mM EDTA; pH 8) previamente atemperado a 50 °C, cada lavado será de 20 min a 50 °C en agitación.
- Retirar el TE y añadir 5 ml de TE fresco. Conservar así los bloques a 4 °C hasta el día siguiente.

DIGESTIÓN DEL ADN

• Cortar una porción del bloque de agarosa del grosor de un porta e introducirlo en un tubo eppendorf. Se realiza en dos pasos:

–Preincubación: termobloque a 37 °C, 15 min en 200 µl del buffer H 10X diluido en agua bidestilada. Pasado ese tiempo retiramos el buffer de preincubación y añadimos la enzima.

–Incubación: termobloque a 37 °C, 180 min en 200 µl de la enzima *Xba*I (10 U/µl por muestra) diluida en buffer H.

ELECTROFORESIS

Una vez terminada la digestión, montar los cortes de bloque sobre los dientes del peine para la electroforesis. Preparar el gel con 150 ml de agarosa SeakemGold al 1% en TBE 0,5X. Atemperar la agarosa a 55 °C antes de añadirla al molde en el que se ha colocado el peine.

Preparar 2 l de tampón TBE, de manera que las concentraciones 1X sean de 0,089 M de Tris base; 0,089 M de ácido bórico (pH 8,3) y 2 mM Na₂EDTA (diluimos 200 ml de TBE 5x con 1.800 ml de agua destilada). Vertemos el tampón diluido en la cubeta de electroforesis y dejamos enfriar a 14 °C. Colocamos el gel y realizamos la electroforesis.

Condiciones de electroforesis en el CHEF Mapper para *E. coli*:

- Auto Algorithm
- 30 kb-low MW-600 kb-high MW
- Pulso inicial: 2,16 s; Pulso final: 54,17 s; Tiempo de electroforesis: 21.30 h

REVELADO DEL GEL

Tinción del gel en agua destilada con 10 µl/ml de bromuro de etidio (de la solución stock 10 mg/ml) durante 20-30 min en agitación. A continuación, eliminamos el baño y lavamos el gel al menos 1 h en agua destilada en agitación. La captura de imagen de los geles para su posterior tratamiento con el programa BioNumerics se realizó con el sistema de fotodocumentación GelDoc (BioRad) y el programa Quantity One 4.6.3.

3.7. Análisis estadístico

Para determinar el grado de asociación estadística entre las variables en estudio, se aplicó el test exacto de Fisher, considerando significativos valores menores a 0,05 ($p < 0,05$).





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron un total de 1.253 muestras de alimentos, incluidas 950 obtenidas por muestreo directo en puntos de venta al consumidor en la ciudad de Lugo (200 de carne de vacuno, 200 de carne de cerdo, 200 de carne de ave y 350 de productos agrícolas), 171 procedentes de carnes y 132 procedentes de productos lácteos remitidas por entidades externas al LREC para su análisis antes de la puesta en circulación con destino al consumidor. En las 1.253 muestras de alimentos se determinó el NMP de *E. coli*, la presencia de *E. coli* diarreagénicos, la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y la presencia del grupo clonal ST131.

4.1. Número más probable de *E. coli* por gramo (NMP)

Como se comentó en el apartado de Introducción, el hábitat natural de *E. coli* es el tracto intestinal del hombre y de la mayor parte de los animales. Al tratarse de una bacteria intestinal, *E. coli* se excreta diariamente de manera abundante con las heces y un alto porcentaje sobrevive, al menos inicialmente, en el medio ambiente, en el agua y en los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Hartl y Dykhuizen, 1984).

NMP en carne de vacuno

Detectamos la presencia de *E. coli* en 56 (28%) de las 200 muestras de carne picada de vacuno obtenidas por muestreo directo en puntos de venta al consumidor en la ciudad de Lugo. Este valor es comparable al obtenido en estudios similares sobre calidad microbiológica en carne picada de vacuno en EE.UU. (25,2%) con 102 muestras positivas para *E. coli* de 404 analizadas (Zhao *et al.* 2002), o en Australia (17,8%) con 64 de 360 analizadas (Philips *et al.* 2008), pero muy inferior al detectado en otro estudio en EE.UU. (69% para carne de vacuno, y específicamente, 70% para carne picada) (Kegode *et al.* 2008).

De las 200 muestras analizadas en este estudio, 144 (72%) presentaron recuentos de *E. coli* inferiores a 10 ufc/g y 25 muestras (12,5%) recuentos superiores a 50 ufc/g (Tabla 48). El Reglamento (CE) N° 2073/2005 (y posteriores modificaciones), establece los criterios microbiológicos para determinados microorganismos y las normas de aplicación que

deben cumplir los explotadores de empresas alimentarias, los cuales velarán porque los productos alimenticios cumplan los criterios microbiológicos pertinentes establecidos en cada fase de producción, transformación y distribución de los alimentos, incluida la venta al por menor. En el Anexo I, capítulo 2 de este Reglamento, se recogen los “Criterios de higiene de los procesos”, que para el caso de *E. coli* en carne picada en la fase final del proceso de fabricación, se indica que un resultado sería insatisfactorio “si uno o varios valores observados son >500 ufc/g o más de 2 de 5 muestras presentan valores entre 50-500 ufc/g” (Tabla 32, página 99). La acción indicada para estos casos sería “Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas”. De acuerdo con este criterio microbiológico, 7 (4%) de las 200 muestras de carne picada de vacuno analizadas en el presente estudio (2011-2012), presentaron un resultado claramente insatisfactorio con recuentos de *E. coli* >500 ufc/g (Tabla 48).

Tabla 48. NMP de *E. coli* (ufc/g) en carne picada de vacuno (octubre 2011- julio 2012)

NMP <i>E. coli</i>	Carne picada vacuno n=200
<10	144 (72%)
10-49	31 (16%)
50-500	18 (9%)
>500	7 (4%)

En la Tabla 49 se puede observar la comparación de resultados obtenidos en los recuentos de *E. coli* por gramo en carne picada de vacuno fresca sin envasar (110 muestras de las 200 procesadas) del presente estudio (2011-2012), con los datos previos obtenidos en el LREC, en los que no se había analizado carne de vacuno envasada en atmósfera modificada (1995-2009) (Blanco J.E. *et al.* 1996b, 1996d; Blanco *et al.* 2003; Mora, 2002; Román, 2002; Núñez, 2003; López, 2004; Mora *et al.* 2003, 2007a, 2011b; Herrera, 2005, 2008, 2010; Justel, 2005; Losada, 2005; García, 2009; Fernández, 2010).

De forma global, para el periodo 1995-2012, el porcentaje total de muestras de carne picada de vacuno con recuentos de *E. coli* <10 ufc/g fue del 66% y del 12% para muestras con recuentos de *E. coli* >99 ufc/g.

Tabla 49. NMP de *E. coli* (ufc/g) en carne picada de vacuno fresca (1995-2012)

NMP	1995	1996	1997	1998	2001	2002	2003	2005	2006	2007	2008	2009	2011*	2012*	Total
Nº de muestras	58	91	173	133	80	20	230	250	60	100	170	100	40	70	1.575
<10	23	45	100	88	65	15	152	167	49	83	108	63	34	49	1.041
	40%	49%	58%	66%	81%	75%	66%	67%	82%	83%	64%	63%	85%	70%	66%
10-99	15	27	44	28	13	3	53	61	8	12	43	23	3	13	346
	26%	30%	25%	21%	16%	15%	23%	24%	13%	12%	25%	23%	8%	19%	22%
100-999	12	10	22	8	2	1	16	20	3	4	11	10	3	5	127
	21%	11%	13%	6%	3%	5%	7%	8%	5%	4%	6%	10%	8%	7%	8%
>999	8	9	7	9	0	1	9	2	0	1	8	4	0	3	61
	14%	10%	4%	7%	0%	5%	4%	1%	0%	1%	5%	4%	0%	4%	4%
>99	20	19	29	17	2	2	25	22	3	5	19	14	3	8	188
	34%	21%	17%	13%	3%	10%	11%	9%	5%	5%	11%	14%	8%	11%	12%

*Solo se incluyeron en esta tabla las 110 muestras de carne fresca de las 200 totales analizadas en este estudio

Si analizamos la progresión de estos resultados a lo largo del tiempo (Figura 30), podemos observar que en el caso del número de muestras con recuentos de *E. coli* <10 ufc/g, y a pesar de que se aprecia una tendencia al alza, desde el año 2001 la evolución es irregular, siendo el porcentaje en algunos casos inferior al 70%. Lo mismo se aprecia en el caso del porcentaje de muestras con recuentos de *E. coli* >99 ufc/g, que muestra una disminución significativa en el periodo 1995-2001, pero oscilatoria a partir de ese año. En ambos casos hemos constatado que esta oscilación está correlacionada con el factor estacional, ya que los máximos de muestras con recuentos de *E. coli* <10 ufc/g y los mínimos de >99 ufc/g coinciden con los muestreos realizados en meses más fríos; por el contrario, los picos máximos de muestras con >99 ufc/g y los mínimos con recuentos de *E. coli* <10 ufc/g se corresponden con los muestreos realizados en meses más cálidos.

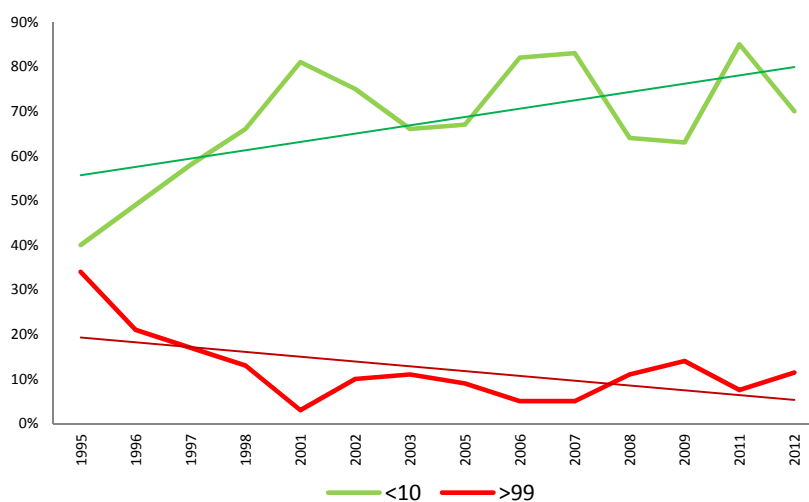


Figura 30. Evolución del NMP de *E. coli* por gramo (1995-2012)

La contaminación por *E. coli* detectada a este nivel (punto de venta al consumidor), en las muestras de carne picada, podría deberse a malas prácticas de higiene en matadero o en los establecimientos comerciales. Este hecho se analizó en un estudio anterior (Herrera, 2010), en el que se apreciaron diferencias significativas en los recuentos entre establecimientos comerciales que compartían mismo matadero y cadena de transporte, lo que se asociaría con una mala manipulación, especialmente en el establecimiento de venta.

NMP en carne de cerdo

Se detectó la presencia de *E. coli* en 49 (24,5%) de las 200 muestras de carne picada de cerdo obtenidas por muestreo directo en puntos de venta al consumidor en la ciudad de Lugo. Este valor es muy inferior al obtenido por Kegode y colaboradores (2008) en EE.UU. para el mismo tipo de muestra (66,7%; 14 de 21 muestras de carne picada de cerdo) y ligeramente superior al obtenido para otras muestras de carne fresca de cerdo en Corea (14,9%; 201 de 1.350 muestras de carne) (Lee *et al.* 2009), o en EE.UU. (16,3%; 34 de 209 chuletas) (Zhao *et al.* 2001).

De las 200 muestras analizadas en este estudio, 151 (75,5%) presentaron recuentos de *E. coli* inferiores a 10 ufc/g y 24 muestras (12%) recuentos superiores a 50 ufc/g (Tabla 50). De acuerdo con el criterio microbiológico del Reglamento (CE) Nº 2073/2005 (y posteriores modificaciones) (Tabla 32, página 99), 6 (3%) de las 200 muestras de carne picada de cerdo analizadas presentaron un resultado claramente insatisfactorio con recuentos de *E. coli* >500 ufc/g (Tabla 50).

Tabla 50. NMP de *E. coli* (ufc/g) en carne picada de cerdo (enero 2011-junio 2012)

NMP <i>E. coli</i>	Carne picada cerdo N=200
<10	151 (75,5%)
10-49	25 (13%)
50-500	18 (9%)
>500	6 (3%)

NMP en carne de ave

Se detectó la presencia de *E. coli* en 111 (55,5%) de las 200 muestras de pechuga de pollo obtenidas por muestreo directo en puntos de venta al consumidor en la ciudad de Lugo.

Tan solo el 45,5% de las muestras presentaron recuentos de *E. coli* inferiores a 10 ufc/g, mientras que 45 muestras (22,5%) tuvieron recuentos superiores a 50 ufc/g, incluidas 6 (3%) con valores superiores a 500 ufc/g (Tabla 51). Por lo tanto, los recuentos en carne de ave son realmente muy elevados y especialmente preocupantes, por lo que se requiere introducir urgentemente medidas correctoras.

Los datos recogidos en otros estudios indican valores que oscilan en un amplio rango, desde un 60,7% de muestras de pechuga de pollo positivas para *E. coli* en el estudio de Kegode y colaboradores (2008) en EE.UU.; 38,7% de las canales de pollo en el estudio de Zhao y colaboradores (2001) también en EE.UU.; al 4,6% determinado en muestras de carne de pollo en Corea (Lee *et al.* 2009).

Tabla 51. NMP de *E. coli* (ufc/g) en carne de pollo (septiembre 2009- diciembre 2010)

NMP <i>E. coli</i>	Pechuga pollo n=200
<10	89 (45,5%)
10-49	66 (33%)
50-500	39 (20%)
>500	6 (3%)

NMP en productos agrícolas

Se detectó la presencia de *E. coli* en 9 (2,6%) de las 350 muestras de verduras y hortalizas obtenidas por muestreo directo en puntos de venta al consumidor en la ciudad de Lugo. Las muestras positivas: 1 pepino de 56 (1,8%), 5 lechugas de 78 (6,4%) y 3 ensaladas envasadas de 125 (2,4%), presentaron recuentos de *E. coli* de <99 ufc/g (Tabla 52).

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005 (y posteriores modificaciones), establece en el Anexo I, capítulo 2, los “Criterios de higiene de los procesos”, que para el caso de *E. coli* en frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo), un resultado sería satisfactorio en la fase de elaboración, “si todos los valores son inferiores o iguales a 100 ufc/g” (Tabla 32, página 99). De acuerdo con este criterio microbiológico, las 3 ensaladas envasadas listas para el consumo, positivas para *E. coli*, presentarían recuentos satisfactorios.

Significativamente superior fue el valor obtenido (14,8% de muestras positivas para *E. coli*) en un estudio muy similar llevado a cabo en Lérida (Abadias *et al.* 2008), en el que se

analizaron 300 muestras de productos frescos mínimamente procesados de frutas, verduras, hortalizas y brotes, adquiridos en varios establecimientos durante el periodo 2005-2006. Entre otras, se detectó la presencia de *E. coli* en 2 (7,1%) de las 28 hortalizas completas muestreadas (1 lechuga y 1 endivia); en 6 (40%) de 15 muestras de brotes y en 22 (16,7%) de las 132 ensaladas listas para el consumo. Además, a diferencia de lo encontrado en el presente estudio, 4 de las 15 muestras de brotes (26,6%) presentaron resultados insatisfactorios para los recuentos de *E. coli* según el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 (y posteriores modificaciones), con valores >1.000 ufc/g (Abadias *et al.* 2008).

Tabla 52. NMP de *E. coli* (ufc/g) en productos agrícolas (junio 2011-noviembre 2012)

Producto	Nº	<10	%	>99	%
Pepino	56	55	98,2%	0	0%
Tomate	60	60	100%	0	0%
Lechuga	78	73	93,6%	0	0%
Brotes de soja	10	10	100%	0	0%
Brotes de alfalfa	2	2	100%	0	0%
Endivia	2	2	100%	0	0%
Brécol	7	7	100%	0	0%
Puerro	2	2	100%	0	0%
Pimiento	6	6	100%	0	0%
Zanahoria	1	1	100%	0	0%
Cebolleta	1	1	100%	0	0%
Ensalada envasada	125	122	97,6%	0	0%
TOTAL	350	341	97,4%	0	0%

NMP en productos lácteos

Se analizaron un total de 132 muestras de productos lácteos de origen ovino, concretamente, muestras de distintas fases del proceso de producción de quesos curados: 70 cuajadas de la fase de coagulación y 62 quesos elaborados con leche cruda de oveja (46 quesos con 100-120 días de maduración y 16 de producto final con 7 meses de maduración).

Detectamos la presencia de *E. coli* en 72 de los 132 productos lácteos analizados, concretamente, en el 71,4% de las cuajadas (50 de las 70), en el 39,1% de los quesos con 100-120 días de maduración (18 de los 46) y en el 25% de los quesos con 7 meses de maduración (4 de los 16). Correlativamente, se determinaron recuentos de *E. coli* superiores a 99 ufc/g en el 18,6% de las cuajadas, el 13% de los quesos con 100-120 días de maduración y en el 0% de los quesos con 7 meses de maduración. Además, un 2,8% de

los 132 productos analizados (2 cuajadas y 1 queso con 4 meses de maduración) presentaron recuentos de *E. coli* superiores a 1.000 ufc/g (Tabla 53).

Todas las muestras analizadas eran productos lácteos elaborados con leche cruda de oveja, por lo que era esperable encontrar recuentos de *E. coli* elevados, especialmente en el caso de las cuajadas que pasan por una fase de coagulación previa de la leche, calentando la misma en cubas a 30 °C durante 45 min, lo que favorece el crecimiento de los microorganismos. Igualmente, es esperable una reducción en los recuentos a medida que progresa la maduración de los quesos, ya que durante este proceso se almacenan en cámaras a temperaturas de 10-12 °C, y según transcurre la maduración, se va reduciendo la temperatura progresivamente. Este proceso de almacenamiento en frío/maduración conlleva una disminución significativa de la actividad de agua del alimento (a_w), con la consiguiente reducción de la carga bacteriana de los quesos.

El Reglamento (CE) N° 2073/2005 (y posteriores modificaciones), establece en el Anexo I, capítulo 2, los “Criterios de higiene de los procesos”, que para el caso de *E. coli* en queso a base de leche o suero sometido a tratamiento térmico, un resultado sería satisfactorio en la fase de elaboración “si todos los valores son inferiores o iguales a 100 ufc/g”, y un resultado sería insatisfactorio “si uno o varios valores observados son >1.000 ufc/g o más de 2 de 5 muestras presentan valores entre 100-1.000 ufc/g” (Tabla 32, página 99). La fase en la que se aplica este criterio sería en el momento del proceso de fabricación en el que se prevea que el recuento de *E. coli* será el máximo, que en el caso de quesos que no pueden favorecer el crecimiento de *E. coli* sería al principio de la maduración. De acuerdo con este criterio microbiológico, 1 de los 46 quesos en fase de curación (100-120 días) presentó un resultado insatisfactorio, con un recuento de 2.530 ufc/g (Tabla 53). Las acciones recomendadas de acuerdo al Reglamento serían mejoras en la higiene de la producción y en la selección de las materias primas.

Tabla 53. NMP de *E. coli* (ufc/g) en productos lácteos (julio 2011-noviembre 2014)

Fase del proceso	N°	<10 ufc/g	>100 ufc /g	>1.000 ufc /g
Coagulación	70	20 28,6%	13 18,6%	2 2,8%
Curado (100-120 días)	46	28 60,9%	6 13%	1 2,2%
Curado (7 meses)	16	12 75%	0 0%	0 0%
TOTAL	132	60 45,4%	19 14,4%	3 2,3%

NMP en carnes de importación

Las 171 muestras remitidas por entidades externas (entre marzo de 2013 y mayo de 2014) llegaron en 33 partidas de 5 submuestras (31 partidas de carne de vacuno y 2 de ovino) y 6 partidas de 1 única unidad (carne de vacuno). En total se analizaron 161 submuestras de carne de vacuno en forma de piezas deshuesadas y 10 de carne de ovino (paletas). Se detectó la presencia de *E. coli* en 25 de las 171 muestras (14,6%). Concretamente, resultó positiva 1 (16,7%) de las 6 muestras individuales de carne de vacuno, y 24 submuestras incluidas en 14 partidas (14/33; 42,4%) de carne de vacuno. La mayoría de las muestras (146/171; 85,4%) presentaron recuentos de *E. coli* inferiores a 10 ufc/g (Tabla 54).

Tabla 54. NMP de *E. coli* (ufc/g) en carnes de importación (marzo 2013- mayo 2014)

NMP <i>E. coli</i>	Carnes de importación n=171
<10	146 (85,4%)
10-49	15 (8,8%)
50-500	8 (4,7%)
>500	2 (1,2%)

Philips y colaboradores (2012) analizaron en 2011 la calidad microbiológica de piezas de vacuno deshuesadas y congeladas en 29 plantas australianas, y detectaron *E. coli* en 61 (10,7%) de 572 lomos y en 144 (25,2%) de 572 redondos de vacuno. En otro estudio realizado en Canadá directamente en matadero, se determinó la presencia de *E. coli* en 14,6% de las canales de vacuno muestreadas y la mayoría de las muestras (98,9%) presentaron recuentos de *E. coli* inferiores a 10 ufc/g (Bohaychuk *et al.* 2011).

Comparación del NMP entre los grupos de alimentos analizados

Al comparar los resultados obtenidos entre los grupos de alimentos adquiridos en puntos de venta al consumidor en la ciudad de Lugo encontramos, como cabía esperar, que el número de muestras contaminadas por *E. coli* fue muy superior en carnes que en verduras y hortalizas (56% de carnes positivas vs. 2,6% de verduras y hortalizas; $p < 0,05$). También encontramos diferencias entre tipos de productos cárnicos (Figura 31), con unos niveles significativamente superiores de contaminación por *E. coli* en la carne de ave (55,5% de las muestras positivas), en comparación con la carne picada de vacuno

(28%) y la carne picada de cerdo (24,5%) ($p < 0,05$). El hecho de que se detecte un mayor nivel de contaminación en la carne de ave estaría, en gran parte, relacionado con la manipulación durante el sacrificio en matadero, especialmente con las fases de escaldado y desplumado. Curiosamente, detectamos un nivel de recuentos insatisfactorios (>500 ufc/g) similar en los tres tipos de carne (4% de las muestras de vacuno y 3% de las de cerdo y pollo, respectivamente). Johnson y colaboradores (2005), en un estudio llevado a cabo en Minneapolis, también encontraron diferencias significativas en cuanto a la presencia de *E. coli* y los diferentes grupos de alimentos analizados, aunque con niveles de contaminación muy inferiores a los de nuestro estudio (16% en carne de ave; 5% en carne de vacuno y cerdo; 0,7% en productos elaborados).

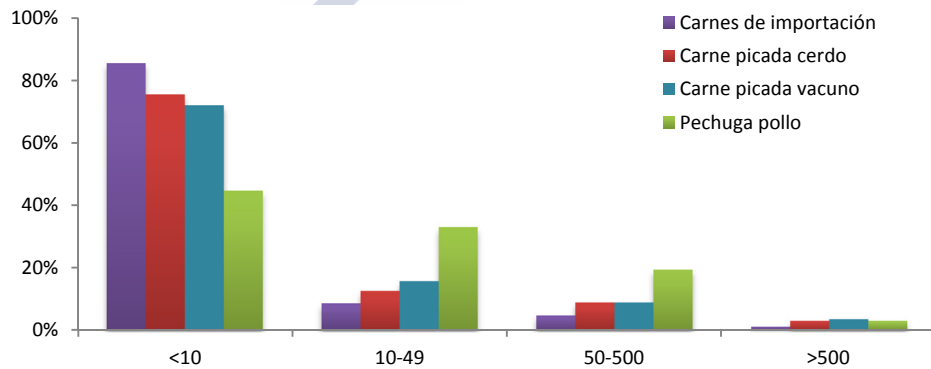


Figura 31. NMP de *E. coli* (ufc/g) en carnes

También comparamos los datos obtenidos de las muestras de carnes en relación con el tipo de presentación (envasadas en atmósfera modificada o sin envasar). Los resultados fueron completamente diferentes según el origen cárnico (Tabla 55). Mientras que no se detectaron diferencias significativas en la carne picada de vacuno, la calidad microbiológica fue significativamente mejor para la carne picada de cerdo envasada y significativamente peor para la carne envasada de pollo, de acuerdo con los recuentos.

Tabla 55. Resultados del NMP de *E. coli* (ufc/g) de carnes fresca y envasada en atmósfera modificada

NMP	Vacuno fresca n=110	Vacuno envasada n=90	p^a	Cerdo fresca n=155	Cerdo envasada n=45	p^a	Pollo fresca n=170	Pollo envasada n=30	p^a
<i>E. coli</i>									
<10	83 (75%)	61 (68%)		110 (71%)	41 (91%)	0,003	84 (49%)	5 (17%)	0,000
10-49	14 (13%)	17 (19%)		21 (14%)	4 (9%)		55 (32%)	11 (37%)	
50-500	8 (7%)	10 (11%)		18 (12%)	0	0,008	28 (16%)	11 (37%)	0,013
>500	5 (5%)	2 (2%)		6 (4%)	0		3 (2%)	3 (10%)	0,045

^a Únicamente se muestran los valores que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$)

La explicación podría ser que la composición de las atmósferas modificadas está diseñada principalmente para inhibir los microorganismos alterantes que producen cambios sensoriales indeseables en el color, textura, sabor y olor de la carne. Sin embargo, la calidad microbiológica final va a depender, en gran medida, de la carga microbiana inicial y de que no se rompa la cadena de frío, lo que permitiría a otros microorganismos multiplicarse con facilidad (algo que ocurriría en carnes de peor calidad con recuentos altos de *E. coli*). Este hecho cuestionaría el uso de atmósferas modificadas, cuyo fin es incrementar la vida útil en productos como la carne de ave.

4.2. *E. coli* diarreagénicos

4.2.1. Prevalencia y patotipos

Siguiendo el protocolo detallado en la Tabla 36 (Material y Métodos, página 118), se analizaron las 950 muestras de alimentos obtenidas en diferentes puntos de venta de la ciudad de Lugo, para determinar la presencia de los patotipos diarreagénicos ECVT, ECEA, EPEC (típicos y atípicos), ECET y ECEI. Utilizando el mismo protocolo, pero solo para la determinación de ECVT, se analizaron los 132 productos lácteos y las 171 muestras de carnes de importación recibidas en el LREC.

En la Tabla 56 se detallan las prevalencias y patotipos detectados entre las 950 muestras obtenidas en Lugo. Mediante PCR se detectó la presencia de ECVT en el 4,3% de las muestras analizadas, de ECEPa en el 27% y ECET en el 0,1%. Ninguna de las 950 muestras fue positiva para los patotipos ECEPt, ECEA, ni para ECEI.

Tabla 56. Prevalencia y patotipos de *E. coli* diarreagénicos en muestras de carne y productos agrícolas

Muestras	ECVT	ECVT	ECEPa	ECEPa	ECET	ECET
	detección ^a	aislamiento ^b	detección ^a	aislamiento ^b	detección ^a	aislamiento ^b
Carne picada de vacuno (n=200)	20 (10%)	16 (8%)	53 (26,5%)	33 (16,5%)	0	0
Carne picada de cerdo (n=200)	17 (8,5%)	12 (6%)	47 (23,5%)	28 (14%)	0	0
Pechuga de ave (n=200)	2 (1%)	2 (1%)	152 (76%)	126 (63%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)
Productos agrícolas (n=350)	2 (0,6%)	2 (0,6%)	5 (1,4%)	2 (0,6%)	0	0
TOTAL	41 (4,3%)	32 (3,4%)	257 (27%)	189 (19,9%)	1 (0,1%)	1 (0,1%)

^aDetección mediante PCR de los genes de virulencia asociados al patotipo; ^b Aislamiento de colonias
Ninguna de las 950 muestras fue positiva para ECEPt, ECEA y ECEI

Finalmente, se aislaron colonias ECVT de 32 muestras (3,4%) y ECEPa de 189 muestras (19,9%), en los 3 tipos de carnes y en los productos agrícolas. Además, se aisló ECET de 1 muestra (0,1%) de pechuga de pollo. Aunque era de esperar una mayor prevalencia de ECVT en carne picada de vacuno (8% de muestras con aislamientos), por ser el ganado vacuno el reservorio por excelencia de este tipo de cepas, la diferencia en relación con la carne de cerdo (6% de muestras con aislamientos) no fue significativa ($p=0,279$); tampoco hubo diferencia en la prevalencia de ECEPa entre ambos tipos de carne ($p=0,289$). Por el contrario, los niveles de contaminación por ECVT y ECEPa en pechuga de pollo fueron completamente distintos, con una prevalencia significativamente más baja de ECVT (1% de muestras con aislamientos) y significativamente más alta de ECEPa (63% de muestras con aislamientos) ($p<0,05$ en todos los casos) (Tabla 56 y Figura 32).

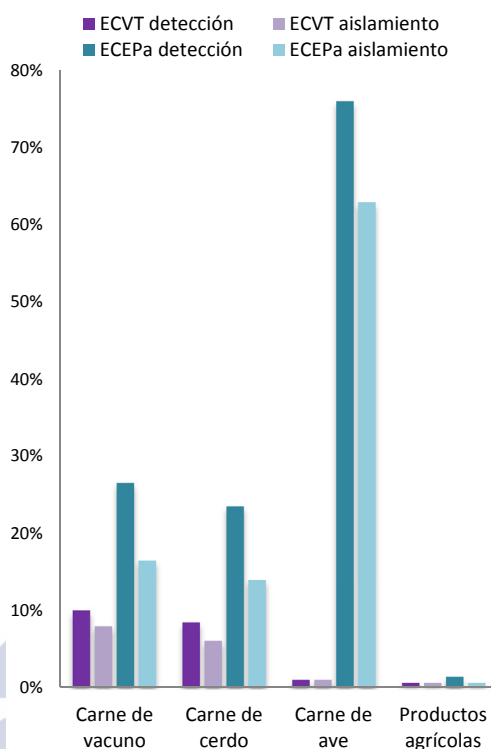


Figura 32. Histograma de prevalencia y patotipos de *E. coli* diarreagénicos en muestras de carne y productos agrícolas

La prevalencia de ECVT en los 132 productos lácteos correspondientes a distintas fases de producción de queso curado (70 cuajadas, 46 quesos de 100-120 días de maduración y 16 quesos de 7 meses de maduración) analizados, exclusivamente, para este patotipo fue de 7,6%, con aislamiento de colonias en 6 muestras (4,5%), concretamente, en 3 cuajadas y en 3 quesos de 100-120 días. No hubo detección ni aislamiento en los quesos de 7 meses de maduración (Tabla 57).

Tabla 57. Prevalencia de ECVT en productos lácteos

Muestras	ECVT detección ^a	ECVT aislamiento ^b
Cuajada (n=70)	6 (8,6%)	3 (4,3%)
Queso 100-120 días (n=46)	4 (8,7%)	3 (6,5%)
Queso 7 meses (n=16)	0	0
TOTAL (n=132)	10 (7,6%)	6 (4,5%)

^aDetección mediante PCR de los genes de virulencia asociados al patotipo; ^b Aislamiento de colonias de ECVT

La prevalencia de ECVT en las 171 muestras de carnes de importación (33 partidas de 5 submuestras y 6 partidas de 1 única muestra = 39 partidas) analizadas, exclusivamente, para este patotipo fue de 5,3% (9 muestras de 7 partidas) con aislamiento de colonias en 5 muestras (2,9%) de 5 partidas, concretamente en 4 muestras de carne de vacuno y en 1 muestra de ovino (Tabla 58).

Tabla 58. Prevalencia de ECVT en carne de importación

Muestras	ECVT detección ^a	ECVT aislamiento ^b
Partidas de carne (n=39)	7 (17,9%)	5 (12,8%)
Muestras (n=171)	9 (5,3%)	5 (2,9%)

^aDetección mediante PCR de los genes de virulencia asociados al patotipo; ^bAislamiento de colonias de ECVT

***E. coli* diarreagénicos en carne de vacuno**

En las 200 muestras de carne picada de vacuno recogidas en la ciudad de Lugo, aislamos 2 tipos de *E. coli* diarreagénicos: ECVT en 16 muestras (8%), incluidas 3 muestras positivas para ECVT O157 (1,5%) y 15 muestras positivas para ECVT no O157 (7,5%); además aislamos colonias de ECEPa en 33 muestras (16,5%). Ninguna de las 200 muestras fue positiva para ECEPT, ECET, ECEI o ECEA (Tabla 56).

En la Tabla 59 aparecen reflejados los datos de detección de 1.575 muestras de carne picada de vacuno fresca (no envasada), adquiridas en puntos de venta de la ciudad de Lugo (se incluyeron en esta tabla, exclusivamente, las 110 no envasadas del presente estudio). Destacar la ausencia de positividad para ECVT O157 en el periodo 2005-2009, y el hecho de que aparezca de nuevo este patógeno en el año 2011 (Blanco J.E. *et al.* 1996b, 1996d; Blanco *et al.* 2003; Mora, 2002; Román, 2002; Núñez, 2003; López, 2004; Mora *et al.* 2003, 2007a, 2011b; Herrera, 2005, 2008, 2010; Justel, 2005; Losada, 2005; García, 2009; Fernández, 2010).

En la Figura 33 aparece reflejada la evolución de la prevalencia de ECVT O157 y no O157 durante el periodo 1995-2012. A pesar de que se observa una evolución descendente, las fluctuaciones son importantes, probablemente debidas a diferentes factores como el de tipo estacional.

Tabla 59. Detección de ECVT O157 y no O157 en carne picada de vacuno fresca en Lugo (1995-2012)

Año	Muestras	ECVT O157		ECVT no O157		TOTAL	
1995	58	3	5%	8	14%	10	17%
1996	91	0	0%	8	9%	8	9%
1997	173	1	0,6%	20	12%	21	12%
1998	133	1	0,8%	18	14%	18	14%
2001	80	1	1,3%	6	8%	7	9%
2002	20	0	0%	1	5%	1	5%
2003	230	2	0,9%	29	13%	30	13%
2005	250	0	0%	29	12%	29	12%
2006	60	0	0%	5	8%	5	8%
2007	100	0	0%	9	9%	9	9%
2008	170	0	0%	11	6%	11	6%
2009	100	0	0%	4	4%	4	4%
2011	40	1	2,5%	0	0%	1	3%
2012	70	0	0%	6	9%	6	9%
TOTAL	1.575	9	0,6%	154	9,8%	160	10,2%

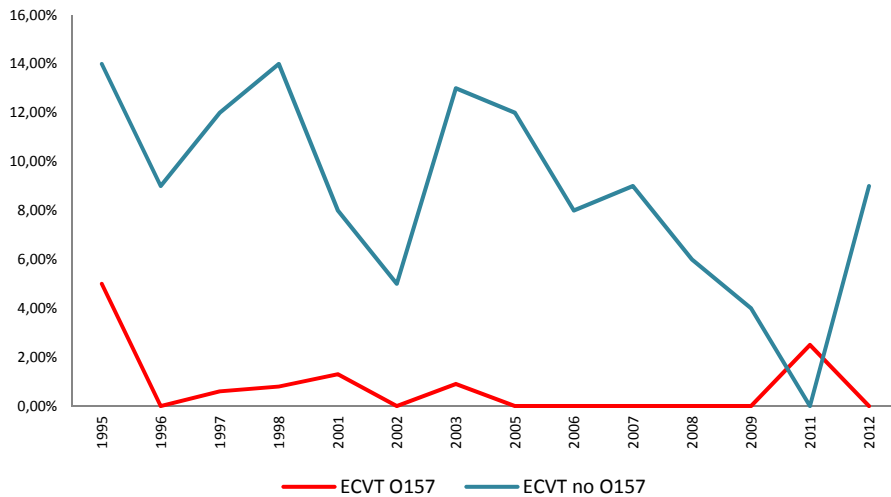


Figura 33. Evolución en la detección de ECVT en carne picada de vacuno fresca en Lugo (1995-2012)

Lo que parece claro es que los niveles detectados de ECVT en carne de vacuno varían mucho no solo entre países, y dependiendo del tipo de producto cárnico muestreado (Zhou *et al.* 2002; Lee *et al.* 2009; Chinen *et al.* 2009; Awadallah *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014), sino también dentro de una misma zona geográfica a lo largo del tiempo. En general, se estima que la prevalencia de ECVT O157 en carne de vacuno a nivel mundial oscila entre el 0,1% y el 54% (Hussein y Bollinguer, 2005). Asimismo, la prevalencia detectada de ECVT no O157 en carne de vacuno, también es muy variable y se estima que, en general, oscila entre el 2,4% y el 30% (Hussein, 2007).

En relación con el patotipo ECEP, observamos que los niveles de prevalencia tienden ligeramente al alza (Figura 34). Tanto en este estudio, como en los previos realizados en el LREC, todas las cepas aisladas de carne de vacuno fueron *bfpA* negativas, y por tanto atípicas (ECEPa) (Herrera, 2010). Este hallazgo es acorde al origen de las propias cepas, puesto que el reservorio principal de las cepas de ECEPt es, fundamentalmente, el ser humano, mientras que en raras ocasiones se aíslan de animales (Trabulsi *et al.* 2002; Hernández *et al.* 2009). Por el contrario, la mayoría de las cepas de ECEP de origen animal carecen del gen *bfpA*, convirtiéndose los animales que las portan en reservorio de cepas ECEPa (Cid *et al.* 2001; Aktan *et al.* 2004; Blanco M. *et al.* 2005; Cortés *et al.* 2005; Krause *et al.* 2005; Malik *et al.* 2006; Aidar-Ugrinovich *et al.* 2007; Vu-Khac *et al.* 2007).

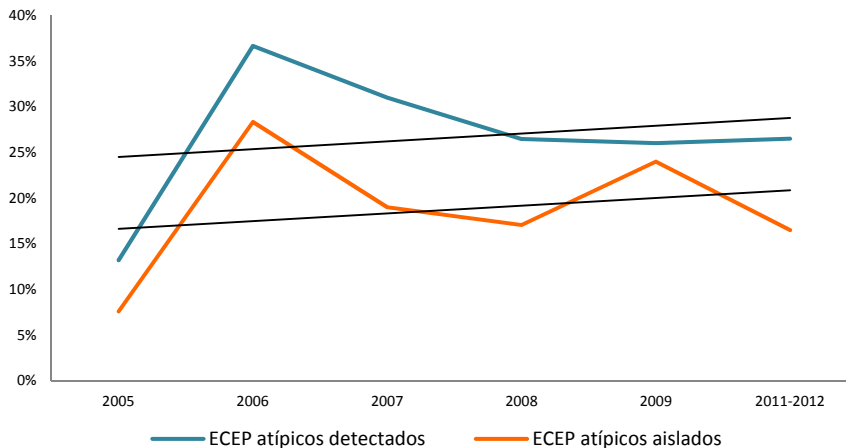


Figura 34. Evolución de la detección/aislamiento de ECEPa en carne de vacuno en Lugo (2005-2012)

Comparamos los resultados obtenidos en el presente estudio para ECVT y ECEPa en relación con el tipo de presentación de la carne. Mientras que no encontramos diferencias significativas en el aislamiento de ECEPa entre producto fresco y envasado en atmósfera modificada (21/110 vs. 12/90, respectivamente; $p=0,184$), sí se observaron diferencias en el aislamiento de ECVT (3/110 vs. 13/77, respectivamente; $p=0,002$). Asociamos esta mayor prevalencia de ECVT en producto envasado al hecho de que 10 de las 16 muestras positivas para ECVT de carne picada de vacuno procedieron de una misma cadena comercial (aunque de distintos establecimientos), de la que se hizo un seguimiento tras detectar una prevalencia inusualmente alta. Las 10 muestras de dicha cadena comercial

eran muestras envasadas en atmósfera modificada (Tabla 60).

Por último, analizamos la relación entre recuentos de *E. coli* y aislamiento de ECVT y ECEPa en carne de vacuno. Comprobamos que más del 60% de las muestras (carne fresca y envasada) positivas para alguno de los patotipos, presentaron recuentos de *E. coli* <100 ufc/g y, por tanto, serían carnes con un resultado microbiológico aceptable según el Reglamento (CE) Nº 2073/2005. En estudios anteriores, ya habíamos constatado que un recuento muy bajo de *E. coli* por gramo no aseguraba la no presencia de ECVT (incluido ECVT O157) (Mora *et al.* 2007a; Mora *et al.* 2011b). En el presente estudio constatamos que 5 (31%) de las 16 muestras con aislamientos positivos para ECVT (incluida 1 muestra positiva para ECVT O157) tenían recuentos inferiores a 10 ufc/g (Tabla 60).

Tabla 60. Muestras positivas para aislamiento de ECVT y ECEPa en carne picada de vacuno fresca y envasada en Lugo (2011-2012) en relación con el NMP de *E. coli* (ufc/g)

Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO VACUNO- CARNE FRESCA					
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT	ECEPa
<10	83 (75,5%)	1	0	1	13
10-99	16 (14,5%)	0	1	1	3
100-999	8 (7,3%)	0	0	0	3
>999	3 (2,7%)	0	1	1	2
TOTAL	110 (100%)	1 (0,9%)	2 (1,8%)	3 (2,7%)	21 (19,1%)
Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO VACUNO- CARNE ENVASADA EN ATMÓSFERA MODIFICADA					
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT	ECEPa
<10	61 (67,8%)	0	4	4	6
10-99	22 (24,4%)	1	4	4 ^a	4
100-999	5 (5,5%)	1	4	4 ^a	2
>999	2 (2,2%)	0	1	1	0
TOTAL	90 (100%)	2 (2,2%)	13 (14,4%)	13 (14,4%)	12 (13,3%)

^aEn 1 muestra se aislaron cepas ECVT O157 y no O157

E. coli diarreagénicos en carne de cerdo

En las 200 muestras de carne picada de cerdo recogidas en la ciudad de Lugo, aislamos 2 tipos de *E. coli* diarreagénicos: ECVT en 12 muestras (6%), incluida 1 muestra positiva para ECVT O157 (0,5%) y 11 muestras positivas para ECVT no O157 (5,5%); además aislamos colonias de ECEPa en 28 muestras (14%). Ninguna de las 200 muestras fue positiva para ECEPt, ECET, ECEI o ECEA (Tabla 56).

Comparada con la carne de vacuno, existen pocos estudios sobre la contaminación de la carne de cerdo por ECVT. En el presente estudio, y en contra de lo que cabía esperar, no encontramos diferencias significativas en el número de muestras positivas para ECVT entre la carne picada de cerdo y de vacuno (6% vs. 8%, respectivamente). Este resultado es comparable a un estudio muy similar llevado a cabo en Washington entre los años 2009-2010, en el que se analizaron 249 muestras de carne picada de vacuno y 231 de carne picada de cerdo adquiridas en 3 cadenas comerciales, con 13 y 12 muestras positivas para aislamiento de ECVT, respectivamente (5,2%, en ambos casos) (Ju *et al.* 2012). Aunque es muy difícil hacer comparaciones entre los diferentes estudios, puesto que el tipo de muestreo, el tamaño de muestra, la metodología y la zona geográfica (entre otros factores) puede afectar significativamente a los resultados, los datos confirman la hipótesis de que la carne de cerdo puede ser una fuente de transmisión de ECVT al hombre (Read *et al.* 1990; Brooks *et al.*, 2001; Mayrhofer *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2015).

Existen muchos menos estudios sobre la presencia de ECEP en carne de cerdo y reportan bajas prevalencias (Lee *et al.* 2009; Comery *et al.* 2013). No sorprende la presencia de ECEPa puesto que hemos constatado que los cerdos de producción portan de forma asintomática este tipo de cepas (LREC, datos no publicados).

Comparamos los resultados obtenidos en el presente estudio para ECVT y ECEPa en relación con el tipo de presentación de la carne. En el caso de la carne picada de cerdo no encontramos diferencias significativas entre producto fresco y envasado en atmósfera modificada, ni para el aislamiento de ECVT (10/155 vs. 2/45, respectivamente; $p=0,468$), ni para ECEPa (25/155 vs. 3/45, respectivamente; $p=0,080$) (Tabla 61).

Por último, analizamos la relación entre recuentos de *E. coli* y aislamiento de ECVT y ECEPa en carne de cerdo. Comprobamos que para ambos patotipos, más del 60% de las muestras positivas de carne fresca y el 100% de las envasadas presentaron recuentos de *E. coli* < 100 ufc/g. Se trataría, por tanto, de carnes con un resultado microbiológico satisfactorio según el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 y, al igual que lo observado en carne de vacuno, un recuento muy bajo de *E. coli* por gramo no asegura la no presencia de cepas patógenas (Tabla 61).

Tabla 61. Muestras positivas para aislamiento de ECVT y ECEPa en carne picada de cerdo fresca y envasada en Lugo (2011-2012) en relación con el NMP de *E. coli* (ufc/g)

Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO CERDO- CARNE FRESCA					
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT	ECEPa
<10	110 (71%)	0	4	4	10
10-99	27 (17,4%)	0	2	2	6
100-999	14 (9%)	0	2	2	7
>999	4 (2,6%)	1	1	2	2
TOTAL	155 (100%)	1 (0,6%)	9 (5,8%)	10 (6,4%)	25 (16,1%)
Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO CERDO- CARNE ENVASADA EN ATMÓSFERA MODIFICADA					
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT	ECEPa
<10	41 (91,1%)	0	1	1	2
10-99	4 (8,9%)	0	1	1	1
100-999	0	0	0	0	0
>999	0	0	0	0	0
TOTAL	45 (100%)	0 (0%)	2 (4,4%)	2 (4,4%)	3 (6,7%)

E. coli diarreagénicos en carne de ave

En las 200 muestras de pechuga de pollo recogidas en la ciudad de Lugo, aislamos 3 tipos de *E. coli* diarreagénicos: ECVT en 2 muestras (1%), ECEPa en 126 muestras (63%) y ECET en 1 muestra (0,5%). Ninguna de las 200 muestras fue positiva para ECEPt, ECEI o ECEA (Tabla 56).

Bai y colaboradores (2015) analizaron 853 muestras de carnes (318 de cerdo, 205 de pollo y 191 de vacuno) adquiridas durante 2013-2014, en supermercados y mercados de China, para determinar la presencia de ECVT. Al igual que nosotros, aunque con diferencias significativas entre vacuno y cerdo, la mayor prevalencia de aislamiento de ECVT fue en carne de vacuno (9,9% de las muestras), en segundo lugar en carne de cerdo (4,1%) y la menor prevalencia fue en carne de pollo (0,5%). En nuestro caso, aislamos ECVT de 2 muestras, cuyo origen más probable sea la contaminación cruzada con carne de otros orígenes, puesto que las aves de corral no son reservorio de este patotipo. Lo mismo se puede deducir de la única muestra en la que aislamos ECET. Schouler y colaboradores (2012) analizaron para un amplio abanico de genes de virulencia, 1.491 cepas de *E. coli* de origen aviar (1.307 procedentes de animales con colibacilosis y 184 del contenido intestinal de animales sanos); ninguna de las 1.491 cepas era portadora de los genes

codificadores para verotoxinas (VT1, VT2), ni tampoco de las enterotoxinas (LT, STa, STb). Sin embargo, estos mismos autores sí encontraron diferencias significativas en la prevalencia del gen *eae* entre las cepas patógenas aviares y las aisladas de animales sanos (2% vs.12%, respectivamente). Curiosamente, en nuestro estudio hemos aislado cepas EPECa del 63% de las muestras. Aunque está claramente establecido que estos animales son portadores de este patotipo, y que la literatura científica recoge datos de su presencia en carne de ave (Lee *et al.* 2009; Comery *et al.* 2013), no hemos encontrado referencias de una prevalencia tan elevada.

Comparamos los resultados obtenidos en el presente estudio para ECEPa en relación con el tipo de presentación de la carne. En el caso de la pechuga de pollo, encontramos una prevalencia significativamente mayor de ECEPa en la carne envasada en atmósfera modificada (101/170 en pechuga fresca vs. 25/30 en envasada; $p=0,009$) (Tabla 62).

También analizamos la relación entre recuentos de *E. coli* y aislamiento de ECVT y ECEPa en carne de cerdo. Comprobamos para ambos patotipos, más del 70% de las muestras positivas de carne fresca y envasada presentaron recuentos de *E. coli* <100 ufc/g. Por lo que, como en la carne de vacuno y cerdo, recuentos bajos de *E. coli* por gramo no aseguran la no presencia de patógenos (Tabla 62).

Tabla 62. Muestras positivas para aislamiento de ECVT y ECEPa en pechuga de pollo fresca y envasada en Lugo (2009-2010) en relación con el NMP de *E. coli* (ufc/g)

Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO POLLO- CARNE FRESCA					
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT	ECEPa
<10	84 (49,4%)	0	1	1	41
10-99	66 (38,8%)	0	1	1	48
100-999	20 (11,8%)	0	0	0	12
>999	0	0	0	0	0
TOTAL	170 (100%)	0 (0%)	2 (1,2%)	2 (1,2%)	101 (59,4%)
Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO POLLO- CARNE ENVASADA EN ATMÓSFERA MODIFICADA					
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT	ECEPa
<10	5 (16,7%)	0	0	0	3
10-99	18 (60%)	0	0	0	15
100-999	6 (20%)	0	0	0	6
>999	1 (3,3%)	0	0	0	1
TOTAL	30 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	25 (83,3%)

***E. coli* diarreagénicos en productos agrícolas**

En las 350 muestras de productos agrícolas recogidas en la ciudad de Lugo, aislamos 2 tipos de *E. coli* diarreagénicos: ECVT y ECEPa en 2 muestras cada patotipo (0,6%, respectivamente). Ninguna de las 350 muestras fue positiva para ECEPt, ECET, ECEI o ECEA (Tabla 56).

Las 350 muestras incluían 125 ensaladas envasadas (en bolsa y sin modificación de atmósfera) listas para el consumo y 225 verduras y hortalizas variadas en fresco (lechuga, tomate, pepino, brotes de soja, brotes de alfalfa, brécol, pimiento rojo, pimiento verde, endivias, puerro, zanahoria y cebolleta). Se obtuvieron aislamientos positivos de 2 lechugas (2/78 lechugas; 2,6%) y en 1 ensalada envasada (1/125; 0,8%). Las 2 cepas ECVT aisladas procedían de las 2 lechugas, una de las cuales fue también positiva para el aislamiento de ECEPa. Para ambos patotipos, las 3 muestras positivas (lechugas y ensalada envasada) presentaron recuentos de *E. coli* <100 ufc/g (Tabla 63).

Tabla 63. Muestras positivas para aislamiento de ECVT y ECEPa en productos agrícolas frescos y envasados en Lugo (2011-2012) en relación con el NMP de *E. coli* (ufc/g)

Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO					
PRODUCTOS AGRÍCOLAS- FRESCO					
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT	ECEPa
<10	219 (97,3%)	0	1	1	0
10-99	6 (2,7%)	0	1	1	1
100-999	0	0	0	0	0
>999	0	0	0	0	0
TOTAL	225 (100%)	0 (0%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	1 (0,4%)
Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO					
ENSALADAS ENVASADAS LISTAS PARA CONSUMO					
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT	ECEPa
<10	122 (97,6%)	0	0	0	1
10-99	3 (2,4%)	0	0	0	0
100-999	0	0	0	0	0
>999	0	0	0	0	0
TOTAL	125 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,8%)

En un estudio realizado en el año 2008 en el LREC, se analizaron 100 lechugas adquiridas en distintos establecimientos de la ciudad de Lugo. El 99% de las muestras presentaron recuentos de *E. coli* <10 ufc/g y el 100% fueron negativas para ECVT y otros *E. coli* diarreagénicos (Mora *et al.* 2011b). Aunque en el presente estudio (2011-2012), 2 lechugas fueron positivas para ECVT (2/78; 2,6%) y ECEPa (1/78; 1,3%) las diferencias no fueron significativas con respecto al estudio anterior ($p > 0,05$ para ambas comparaciones).

Las posibles y principales fuentes de contaminación de productos agrícolas están relacionadas con las malas prácticas agrícolas (como el uso de estiércol mal compostado), con la escorrentía de aguas procedentes de granjas de producción, o con el uso de aguas residuales no tratadas (Buck *et al.* 2003). En áreas geográficas menos desarrolladas, en las que no existe control de este tipo de prácticas, se ponen en evidencia los riesgos microbiológicos. Castro-Rosas y colaboradores (2012) analizaron en Méjico 130 ensaladas listas para el consumo obtenidas en diferentes restaurantes para ECVT, ECET, EPEC y EIEC. Determinaron la presencia de *E. coli* en el 85% de las muestras y en 8 ensaladas (6,1%) aislaron ECVT (3), ECEI (2), ETEC (1) y en 2 ensaladas ECVT+ECEI, y curiosamente no aislaron ECEP de ninguna de las muestras analizadas. Asociaron la presencia de los patógenos diarreagénicos a la mala calidad microbiológica del agua de riego usada en la zona. En nuestro estudio, solo 1 de las 125 (0,8%) ensaladas listas para consumo fue positiva, y de ella se aisló ECEPa.

***E. coli* verotoxigénicos en productos lácteos**

Los 132 productos lácteos correspondientes a distintas fases de producción de queso curado de ovino se analizaron únicamente para ECVT. Las 6 muestras con aislamientos se correspondían con fases de producción previas al consumo para este tipo de queso (3 cuajadas y 3 quesos de 100-120 días de maduración). Además, las 3 muestras de quesos y 2 de las 3 cuajadas positivas presentaban recuentos de *E. coli* <10 ufc/g. Ninguna de las muestras de quesos de 7 meses de maduración fue positiva para ECVT (Tabla 57, página 157; Tabla 64).

La literatura científica ha evidenciado, tanto la presencia de ECVT en diferentes variedades de quesos producidos con leche cruda (Pradel *et al.* 2000; Fach *et al.* 2001; Honish *et al.* 2005; Vernozy-Rozand *et al.* 2005; Rey *et al.* 2006; Caro y García-Armesto, 2007; Stephan *et al.* 2008; Zweifel *et al.* 2010; Madic *et al.* 2011), como su implicación en brotes, especialmente provocados por ECVT O157 (Honish *et al.* 2005; Espié *et al.* 2006). Muchos de estos estudios, especificaban la detección en quesos curados. Concretamente en España, Rey y colaboradores (2006) analizaron 502 productos lácteos de 64 rebaños de ovino y caprino en Extremadura entre los años 2003-2004, incluidas 360 muestras de leche no pasteurizada recogida en tanque, 103 productos de la fase de coagulación

(cuajadas) y 39 quesos; y aunque por PCR detectaron la presencia de ECVT en el 9% de las muestras (29 de leche, 2 cuajadas y 2 quesos), tras analizar hasta 100 colonias, solo aislaron ECVT de 9 muestras de leche. En otro estudio realizado en España sobre queso de Castilla elaborado con leche cruda de oveja con diferentes tiempos de maduración, Caro y García-Armesto (2007) aislaron cepas ECVT de 2 quesos (1 queso de 2,5 meses de maduración y otro de 12 meses). Por tanto, y a pesar de que nosotros ni detectamos ni aislamos ECVT de las muestras de quesos de 7 meses de maduración, este proceso no garantiza la ausencia del patógeno, incluso en periodos de hasta 12 meses (Caro y García-Armesto, 2007). Es crucial una buena calidad microbiológica de la leche para reducir el riesgo de la presencia de estos patógenos en quesos elaborados con leche cruda, máxime si los quesos son frescos o con periodos cortos de maduración (Montet *et al.* 2009).

Tabla 64. Muestras positivas para aislamiento de ECVT en productos lácteos (2011-2014) en relación con el NMP de *E. coli* (ufc/g)

Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO PRODUCTOS LÁCTEOS: CUAJADAS				
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT
<10	20 (28,6%)	0	0	0
10-99	37 (52,8%)	0	2	2
100-999	11 (15,7%)	0	1	1
>999	2 (2,8%)	0	0	0
TOTAL	70 (100%)	0 (0%)	3 (4,3%)	3 (4,3%)
Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO PRODUCTOS LÁCTEOS: QUESOS				
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT
<10	40 (64,5%)	0	1	1
10-99	16 (25,8%)	0	2	2
100-999	5 (8,1%)	0	0	0
>999	1 (1,6%)	0	0	0
TOTAL	62 (100%)	0 (0%)	3 (4,8%)	3 (4,8%)

E. coli verotoxigénicos en carnes de importación

Las 171 muestras de carne remitidas por entidades externas (33 partidas de 5 submuestras y 6 partidas de 1 única unidad) se analizaron únicamente para ECVT. Se aislaron colonias ECVT de 5 muestras procedentes de 5 lotes (4 muestras de 4 lotes de carne de vacuno y 1 muestra de 1 lote de carne de ovino). Las 5 muestras presentaron recuentos de *E. coli* <100 ufc/g (Tabla 58, página 158; Tabla 65). Se trataría, por tanto, de carnes con un resultado microbiológico satisfactorio según el Reglamento (CE) Nº 2073/2005.

Tabla 65. Muestras positivas para aislamiento de ECVT en carnes de importación (2013-2014) en relación con el NMP de *E. coli* (ufc/g)

Nº MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO CARNES DE IMPORTACIÓN				
NMP <i>E. coli</i>	TOTALES (%)	ECVT O157	ECVT no O157	TOTAL ECVT
<10	146 (85,4%)	0	3	3
10-99	16 (9,4%)	0	2	2
100-999	8 (4,7%)	0	0	0
>999	1 (0,6%)	0	0	0
TOTAL	171	0 (0%)	5 (2,9%)	5 (2,9%)

Las muestras recibidas de carne de vacuno (n=161) provenían de Brasil (n=135), Uruguay (n=16), EE.UU. (n=5) y Argentina (n=5), y las de origen ovino (n=10) de Nueva Zelanda. Las muestras con aislamientos positivos correspondieron a Uruguay (2/16; 12,5%), Brasil (2/135; 1,5%) y Nueva Zelanda (1/10; 10%). Diferentes estudios indican que la prevalencia de ECVT en ganado bovino y ovino en estos países es alta. En Brasil un estudio realizado en Minas Gerais, determinó una prevalencia en animales de producción del 39,2% (vacuno de carne), 57,5% (caprino) y 17,5% (vacuno de leche) (Oliveira *et al.* 2008). Por otro lado, un estudio realizado por el departamento de Agricultura de EE.UU., determinó que el 28% de la carne de vacuno deshuesada importada de Uruguay y el 9,7% de la de Nueva Zelanda era positiva para ECVT (Bosilevac *et al.* 2007). En Nueva Zelanda, Cookson y colaboradores (2006a, 2006b) determinaron una prevalencia de ECVT superior en ganado ovino que en el bovino (aislamientos del 65,9% vs. 27,3%, respectivamente).

De acuerdo con el documento guía vigente, para la aplicación del artículo 14 del Reglamento (EC) Nº 178/2002 en relación con los alimentos contaminados por ECVT (instrucción IM/04/2014 del Ministerio de Sanidad), y dado que los alimentos se clasificaron de bajo riesgo, los resultados obtenidos supondrían la liberación de todas las partidas, puesto que se descartó la presencia, en las muestras positivas para *vt*, de los genes *eae* y *aaiC+aggR* (Figura 19, página 103). No obstante, según el borrador que está siendo elaborado por la Comisión Europea (Documento orientativo relativo a alimentos contaminados con ECVT) (Figura 20, página 106), las partidas corresponderían a la categoría b, por lo que en todos los casos en los que hubo aislamiento de ECVT, la recomendación sería la retirada de las partidas.

4.2.2. Serotipos de las cepas ECVT

Se recuperaron un total de 51 cepas ECVT diferentes de 43 (3,4%) de las 1.253 muestras analizadas (200 de carne de vacuno, 200 de carne de cerdo, 200 de carne de ave, 350 de productos agrícolas, 132 de productos lácteos y 171 de carnes de importación) (Tabla 66). Para su recuperación se ensayaron por PCR (vt1 y vt2) un mínimo de 50 colonias de *E. coli* de las 60 muestras con confluentes positivos, de acuerdo con el protocolo detallado en la Tabla 36 (Material y Métodos, página 118).

Tabla 66. Número de cepas ECVT por tipo de muestra

Muestras	ECVT aislamiento ^a	Nº cepas ECVT ^b
Carne picada de vacuno (n=200)	16 (8%)	22
Carne picada de cerdo (n=200)	12 (6%)	13
Pechuga de pollo (n=200)	2 (1%)	2
Productos agrícolas (n=350)	2 (0,6%)	2
Productos lácteos (n=132)	6 (4,5%)	6
Carnes de importación (n=171)	5 (2,9%)	6
TOTAL (n=1.253)	43 (3,4%)	51
^a Número de muestras con aislamiento ECVT		
^b De algunas muestras se aisló más de un tipo ECVT		

El serotipado de las 51 cepas ECVT determinó un total de 34 serotipos (Tabla 67), de los cuales, 20 habían sido asociados con anterioridad a cepas ECVT causantes de infecciones en seres humanos (incluimos entre estos 20, los serotipos ONT:H8, ONT:H16, ONT:H21 y ONT:HNM). Por tanto, 36 (70,6%) de las 51 cepas ECVT aisladas de alimentos presentaron serotipos descritos en patología humana con la siguiente distribución: 16 (72,7%) de 22 cepas de carne de vacuno, 10 (77%) de 13 cepas de carne de cerdo, 2 (100%) de 2 cepas de carne de pollo, 2 (100%) de 2 cepas de productos agrícolas, 3 (50%) de 6 cepas de productos lácteos y 3 (50%) de 6 cepas de carne de importación.

Relacionamos los serotipos detectados con la clasificación de Karmali y colaboradores (2003) que establece seropatotipos (A, B, C, D y E) en relación con la virulencia potencial de las cepas (Tabla 12, página 34). Según esta clasificación, 15 (29%) de las 51 cepas ECVT pertenecieron a los seropatotipos relacionados con SUH y CH: los altamente virulentos A (4 cepas O157:H7) y B (4 cepas O26:H11), o al C, que engloba cepas con riesgo potencial elevado (1 cepa O8:H19, 1 cepa O91:H21, 2 cepas O113:H21 y 3 cepas O174:H21). Estas 15 cepas pertenecientes a seropatotipos altamente virulentos o con riesgo potencial elevado, se aislaron de 12 muestras (8 de carne picada de vacuno, 3 de

carne picada de cerdo y 1 de pechuga de pollo). Aunque el serotipo ONT:HNM se ha asociado a SUH, no se le ha asignado seropatotipo (le correspondería el C) por no tener la certeza del tipo de antígeno O y H de las cepas.

Tabla 67. Correspondencia de los serotipos determinados en las 51 cepas ECVT con el seropatotipo según la clasificación de Karmali (Karmali *et al.* 2003)

Serotipos	Nº cepas	Origen	Seropatotipo (Karmali <i>et al.</i> 2003)
O6:H34	1	Carne picada de vacuno	E
O8:H9•	3	Carne picada de cerdo	D
O8:H19•	1	Carne picada de cerdo	C
O8:H30	2	Productos lácteos	E
O26:H11•	4	2 carne picada de vacuno 1 carne picada de cerdo 1 pechuga de pollo	B
O39:H49	1	Carne picada de vacuno	E
O76:H19	1	Productos lácteos	D
O88:H25	1	Carne de vacuno de importación	D
O91:H21	1	Carne picada de vacuno	C
O104:H7	2	1 Carne picada de vacuno 1 Carne de ovino de importación	D
O106:H21	1	Carne picada de cerdo	E
O113:H4	1	Carne picada de cerdo	D
O113:H21•	2	Carne picada de vacuno	C
O130:H11	1	Carne de vacuno de importación	E
O145:H34	1	Lechuga	D
O146:H21•	2	1 Lechuga 1 Productos lácteos	D
O150:H2	1	Carne picada de cerdo	E
O156:H25	1	Carne picada de vacuno	D
O157:H7•	4	3 Carne picada de vacuno 1 Carne picada de cerdo	A
O168:H21	1	Carne picada de cerdo	E
O166:H28•	2	1 Carne picada de cerdo 1 Productos lácteos	D
O174:H21•	3	Carne picada de vacuno	C
O175:H21	1	Carne picada de vacuno	E
O176:H4	1	Productos lácteos	E
O178:H19	2	1 Carne picada de cerdo 1 Carne de vacuno de importación	D
O185:H7	1	Carne de vacuno de importación	E
ONT:H2	1	Carne picada de vacuno	E
ONT:H7	1	Carne picada de vacuno	E
ONT:H8•	1	Carne picada de vacuno	*
ONT:H14	1	Carne de ovino de importación	E
ONT:H16	1	Carne picada de vacuno	D
ONT:H21•	1	Carne picada de vacuno	*
ONT:H28	1	Carne picada de vacuno	E
ONT:HNM•	2	1 Carne picada de cerdo 1 Pechuga de pollo	*

Serotipos: Serotipos detectados en cepas de origen humano; serotipos detectados en pacientes con SUH; •Serotipos detectados en cepas aisladas de carne picada de vacuno en estudios anteriores (1995-2009)

Seropatotipos: *No se asignó seropatotipo a las cepas ONT:H8, ONT:H21 y ONT:HNM porque a pesar de han sido descritos en cepas de origen humano, no tenemos la certeza de que no presenten antígenos O y/o H diferentes.

Carne picada de vacuno

Por alimento, las 22 cepas ECVT aisladas de carne de vacuno procedentes de 16 muestras, presentaron 16 serotipos distintos. Destaca que el 50% de las cepas aisladas de esta carne (11/22) pertenecía a los serotipos A, B o C (O157:H7, O26:H11, O91:H21, O113:H21, O174:H21). Las 11 cepas con serotipos relacionados con SUH y CH se aislaron de 8 muestras, de manera que en 3 muestras de carne se detectaron 2 cepas ECVT diferentes de estos serotipos. Es interesante destacar además, que 2 de estas 11 cepas (O157:H7 y O113:H21) se aislaron de 2 muestras con recuentos de *E. coli* <10 ufc/g.

Nueve de los 16 serotipos encontrados entre las cepas ECVT de carne picada de vacuno del presente estudio no se habían detectado en los estudios previos; ni entre los 61 serotipos de 96 ECVT aisladas de 785 muestras (1995-2003) (Mora *et al.* 2007a), ni entre los 36 serotipos de 53 cepas ECVT aisladas de 680 muestras (2005-2009) (Herrera, 2010). No obstante, la mayoría (11 de 16 serotipos) los habíamos determinado previamente en cepas de origen bovino (carne o heces) y solo los serotipos O39:H49, O104:H7, O175:H21, ONT:H7, ONT:H16 no habían sido detectados en cepas bovinas (Blanco M. *et al.* 2004b; Mora *et al.* 2007a). Concretamente, el serotipo O104:H7 solo lo habíamos asociado hasta ahora a cepas de origen ovino (Blanco M. *et al.* 2003b; Rey *et al.* 2003; Mora *et al.* 2011b). También, Bai y colaboradores (2015) en China encontraron una amplia variedad de serotipos entre las 62 cepas ECVT aisladas de 853 muestras de carne de origen bovino, ovino, porcino y de ave, con un total de 33 serotipos. No detectaron ninguna cepa O157:H7, pero los autores lo asociaron a no incluir en su protocolo la separación inmunomagnética. Curiosamente, ninguno de los 15 serotipos de sus 21 cepas aisladas de 191 muestras de origen bovino, se encuentran entre los 16 hallados en las 22 cepas de nuestro estudio. Asimismo, Brusa y colaboradores (2012) en Argentina encontraron resultados diferentes a los nuestros, no solo en prevalencias (12,2% de 90 muestras de carne picada de vacuno positivas para aislamiento de ECVT O157 y 14,4% para ECVT no O157), sino también en los serotipos identificados; entre los 12 serotipos de sus 13 cepas ECVT no O157, solo 2 (O113:H21 y O174:H21) están presentes en las cepas de carne de vacuno de nuestro estudio.

Se puede concluir, por tanto, que el 4% de las muestras de carne picada de vacuno que hemos analizado (8 de 200) portaba cepas de seropatotipos altamente virulentos o con riesgo potencial elevado, incluidos 3 serotipos/seropatotipos (O157:H7, seropatotipo A; O26:H11, seropatotipo B; O113:H2, seropatotipo C) frecuentemente detectados entre pacientes del Hospital de Lugo (HULA) (Blanco JE *et al.* 2004; Mora *et al.* 2011b). Además, hemos detectado 4 serotipos (O39:H49, O104:H7, O175:H21, ONT:H7) no descritos previamente en nuestros estudios, ni en cepas ECVT de carne picada de vacuno, ni de otros orígenes (Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Blanco M. *et al.* 2003b, 2004b; Mora *et al.* 2005, 2007a, 2012).

Carne picada de cerdo

Las 13 cepas ECVT aisladas de carne de cerdo procedentes de 12 muestras, presentaron 11 serotipos distintos. El 23% de las cepas aisladas de esta carne (3/13) pertenecía a los seropatotipos A, B o C (O157:H7, O26H11, O8:H19). Las 3 cepas con serotipos relacionados con SUH y CH se aislaron de 3 muestras, una de las cuales (la muestra positiva para O8:H19) presentaba recuentos de *E. coli* <10 ufc/g. Como se comentó al inicio de este apartado y en la Tabla 67, aunque el serotipo ONT:HNM se ha asociado a SUH, no se le ha asignado seropatotipo (le correspondería el C), por no tener la certeza del tipo de antígeno O y H de estas cepas.

Tres (O106:H21, O150:H2, O168:H21) de los 11 serotipos identificados entre las cepas ECVT de carne picada de cerdo del presente estudio no se habían detectado previamente en nuestros estudios entre cepas de distintos orígenes (vacuno, ovino, silvestre o humano) (Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Blanco M. *et al.* 2003b, 2004b; Mora *et al.* 2005, 2007a, 2012). Bai y colaboradores (2015) en China determinaron 8 serotipos en las 14 cepas aisladas de 318 muestras de carne de cerdo, 1 de los cuales (O8:H19, asociado a SUH y CH) también fue identificado en nuestro estudio. Tanto este serotipo (O8:H19), como el O178:H19, figuran entre los más prevalentes en el estudio de Brusa y colaboradores (2012) asociados a carne de vacuno en Argentina.

Se puede concluir, por tanto, que el 1,5% de las muestras de carne picada de cerdo que hemos analizado (3 de 200) portaba cepas de seropatotipos altamente virulentos o con

riesgo potencial elevado (O157:H7, seropatotipo A; O26:H11, seropatotipo B; O8:H19, seropatotipo C).

Carne de ave

Las 2 cepas ECVT aisladas de pechuga de pollo procedentes de 2 muestras, presentaron 2 serotipos asociados a SUH y CH. Es importante destacar que, aunque la prevalencia de ECVT en este tipo de carne fue, como cabía esperar, baja (1%), una de las cepas pertenecía al seropatotipo B (O26:H11) y la otra (ONT:HNM) aislada de una muestra con recuentos de *E. coli* <10 ufc/g correspondería al seropatotipo C asociado también a SUH y CH, aunque en este caso no se le asignó por no tener la certeza del antígeno O y H de la cepa. Bai y colaboradores (2015) obtuvieron un resultado de prevalencia similar al nuestro en carne de pollo (0,5%, 1/205), pero la cepa que aislaron fue identificada como O179:H4, un serotipo que nosotros hemos detectado en cepas de origen ovino (Blanco M. *et al.* 2003b).

Se puede concluir, que aunque la contaminación por cepas ECVT que detectamos de la carne de pollo vendida en los establecimientos de Lugo no es alta, el 1% de las muestras era portadora de cepas ECVT de riesgo potencial elevado para los consumidores.

Productos agrícolas

Las 2 cepas ECVT aisladas de productos agrícolas y procedentes de 2 muestras de lechuga, presentaron 2 serotipos (O146:H21, O145:H34) y aunque ninguno de ellos se ha asociado a SUH y CH, el serotipo O146:H21 (seropatotipo D) es uno de los más frecuentemente detectados en pacientes del HULA en nuestra ciudad (Mora *et al.* 2011b). Este serotipo también lo hemos identificado en cepas ECVT aisladas de carne de vacuno (Mora *et al.* 2007a), de heces de bovino (Blanco M. *et al.* 2004b), y con una elevada prevalencia en heces de ovino (Rey *et al.* 2003; Blanco M. *et al.* 2003b). Asimismo, lo detectamos en 51 cepas (37,8%) de 135 cepas ECVT aisladas de 701 animales silvestres (corzo, jabalí y zorro) muestreados en Galicia (Mora *et al.* 2012), lo que indica que este tipo de cepas es frecuente en nuestra zona geográfica y que pueden llegar a contaminar los productos agrícolas por diferentes fuentes. La otra cepa aislada en el presente estudio de una muestra de lechuga pertenecía a un serotipo (O145:H34)

no detectado en cepas de origen humano en nuestros estudios, sin embargo, sí aparece documentado por otros autores en cepas asociadas con casos de diarrea (Prager *et al.* 2009).

Productos lácteos

Las 6 cepas ECVT aisladas de productos lácteos procedentes de 6 muestras, presentaron 5 serotipos distintos. Como era de esperar, por tratarse de productos elaborados con leche de oveja, la mayoría de estos serotipos (O76:H19, O146:H21, O166:H28, O176:H4) los habíamos identificado previamente en cepas ECVT de origen ovino (Rey *et al.* 2003; Blanco M. *et al.* 2003b, Orden *et al.* 2003). Solo el serotipo O8:H30 (2 cepas) no lo habíamos identificado anteriormente en cepas ECVT de nuestros estudios, sin embargo, Bai y colaboradores (2015) lo encontraron en 2 cepas aisladas de carne de ovino y vacuno, respectivamente. También determinaron el serotipo O176:H4 en 3 de 25 cepas aisladas de carne de ovino.

Ninguna de las cepas aisladas de productos lácteos en nuestro estudio pertenecía a los seropatotipos A, B o C asociados con SUH y CH, pero 3 de los 5 serotipos (O76:H19, O146:H21, O166:H28) habían sido identificados en cepas ECVT de origen humano (seropatotipo D) (Blanco J.E. *et al.* 2004), incluido el O146:H21 frecuentemente identificado en cepas de pacientes con diarrea en el HULA (Mora *et al.* 2011b).

Carnes de importación

Las 6 cepas ECVT aisladas de carnes de importación procedentes de 5 muestras (4 de vacuno y 1 de ovino), presentaron 6 serotipos distintos. Ninguna de las cepas pertenecía a los seropatotipos A, B o C asociados con SUH, pero 3 de los 6 serotipos (O88:H25, O178:H19 identificados en 2 cepas ECVT de carne de importación bovina; y O104:H7 identificado en 1 cepa ECVT de carne de importación ovina) los habíamos determinado previamente en cepas ECVT de origen humano (seropatotipo D). Además, los serotipos O88:H25 y O178:H19 los habíamos identificado en heces de bovino (Blanco M. *et al.* 2004b) y el serotipo O104:H7 en heces de ovino (Blanco M. *et al.* 2003b; Rey *et al.* 2003). El serotipo O104:H7 también aparece identificado en 3 de las 25 cepas aisladas de 126 muestras de carne de ovino en el trabajo de Bai y colaboradores (2015).

Se puede concluir que, globalmente, hemos encontrado una alta heterogeneidad entre las 51 cepas ECVT aisladas de alimentos con 34 serotipos que, en la mayoría de los casos, se correlacionan con el origen animal de la contaminación. Martin y Beutin (2011) también encontraron una significativa correlación entre los animales de producción y los serotipos de ECVT contaminantes de alimentos del mismo origen. En su estudio, en 593 cepas ECVT aisladas de alimentos derivados de animales (bovino, porcino, ovino, caprino y silvestres), detectaron 215 serotipos. Curiosamente, entre esos 215 serotipos no figuran 10 (O8:H30, O39:H49, O104:H7, O106:H21, O145:H34, O150:H2, O156:H25, O168:H21, O175:H21, O176:H4) de los 34 detectados en las cepas del presente estudio, 8 de los cuales (O8:H30, O39:H49, O104:H7, O106:H21, O145:H34, O150:H2, O168:H21, O175:H21) tampoco habían sido detectados en ninguno de nuestros estudios previos.

4.2.3. Genes de virulencia de las cepas ECVT

Siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.4.2 (Material y Métodos, página 121) (Tabla 37, Tabla 40 y Tabla 41), se determinó la presencia de los genes de virulencia ligados al patotipo ECVT (genes *vt1*, *vt2*, *subA*, *stcE*, *E-hlyA*, *saa* y *eae*), se realizó el tipado del gen *eae* en las cepas positivas, y se establecieron los tipos/subtipos de los genes *vt* de las 51 cepas ECVT aisladas en el presente estudio (Tabla 68).

Tabla 68. Serotipos, grupos filogenéticos y genes de virulencia de las 51 cepas ECVT

Tipo de muestra (nº cepas)	Código de cepa	Serotipo	Grupo filogenético	Genes de Virulencia
Carne picada de vacuno (n=22)	13-6a	O157:H7	D	<i>vt2c</i> , <i>eae-γ1</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>stcE</i>
	20-4a	O6:H34	B1	<i>vt2a</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>subA</i>
	20-3b	O175:H21	B1	<i>vt1a</i> , <i>vt2a</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>saa</i>
	30-3a	O113:H21	B1	<i>vt1a</i> , <i>vt2d</i>
	30-4a	O26:H11	B1	<i>vt1a</i> , <i>eae-β1</i> , <i>E-hlyA</i>
	30-4d	ONT:H21	B1	<i>vt1a</i> , <i>vt2c</i>
	37-3a	ONT:H8	B1	<i>vt1a</i> , <i>vt2a</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>saa</i>
	38-4a	ONT:H2	B1	<i>vt1a</i> , <i>eae-ζ1</i> , <i>EhlyA</i>
	43-1a	O157:H7	D	<i>vt1a</i> , <i>vt2c</i> , <i>eae-γ1</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>stcE</i>
	43-5a	O104:H7	B1	<i>vt2a</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>saa</i> , <i>subA</i>
	44-4a	O91:H21	B1	<i>vt2a</i> <i>vt2d</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>saa</i>
	44-4c	O174:H21	B1	<i>vt2c</i>
	45-3a	ONT:H7	B1	<i>vt2c</i>
	46-4a	O157:H7	D	<i>vt2c</i> , <i>eae-γ1</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>stcE</i>
	46-4b	O174:H21	B1	<i>vt2c</i>
	54-4a	O174:H21	B1	<i>vt2c</i>
	82-3a	O39:H49	B1	<i>vt2a</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>saa</i> , <i>subA</i>
	87-6a	ONT:H28	B1	<i>vt1a</i> , <i>eae-ζ1</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>stcE</i>
	93-4a	O156:H25	B1	<i>vt1a</i> , <i>eae-ζ1</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>stcE</i>
	134-3a	O113:H21	B1	<i>vt2d</i> , <i>E-hlyA</i> , <i>subA</i>
147-4b	ONT:H16	A	<i>vt2a</i> <i>vt2g</i>	
194-4a	O26:H11	B1	<i>vt1a</i> , <i>eae-β1</i> , <i>E-hlyA</i>	

Tipo de muestra (nº cepas)	Código de cepa	Serotipo	Grupo filogenético	Genes de Virulencia
Carne picada de cerdo (n=13)	C19-4a	O113:H4	A	<i>vt2d</i>
	C89-6a	O150:H2	B1	<i>vt1a, vt2a, eae-ζ1, E-hlyA</i>
	C120-4a	ONT:HNM	A	<i>vt2e</i>
	C121-4f	O178:H19	B1	<i>vt1a, vt2a vt2d, E-hlyA</i>
	C123-4a	O106:[H21]	B1	<i>vt1c</i>
	C143-4a	O8:H9	A	<i>vt2e</i>
	C145-1a	O8:H9	A	<i>vt2e</i>
	C149-2a	O8:H9	A	<i>vt2e</i>
	C156-5a	O8:H19	B1	<i>vt2e</i>
	C167-1a	O157:[H7]	D	<i>vt1a, vt2c, eae-γ1, E-hlyA, stcE</i>
	C175-4b	O168:H21	B1	<i>vt2a</i>
	C175-4c	O26:H11	B1	<i>vt1a, eae-β1, E-hlyA</i>
	C188-6a	O166:H28	B2	<i>vt1c, vt2b, E-hlyA</i>
Carne de ave (n=2)	P125-4b	ONT:HNM	A	<i>vt2e</i>
	P159-4a	O26:[H11]	B1	<i>vt1a, eae-β1, E-hlyA</i>
Productos agrícolas (n=2)	VH46-6a	O146:H21	B1	<i>vt1c, vt2b, E-hlyA</i>
	VH218-3a	O145:H34	B2	<i>vt2f, eae-α1</i>
Productos lácteos (n=6)	FV17315 (L42-3a)	O76:[H19]	B1	<i>vt1c, E-hlyA</i>
	FV17706 (L60-4a)	O146:H21	B1	<i>vt2b, E-hlyA</i>
	FV17902 (L67-4a)	O8:H30	A	<i>vt2a</i>
	FV18436 (L207-6a)	O166:H28	B2	<i>vt1c, vt2b, E-hlyA</i>
	FV18441 (L212-6a)	O176:[H4]	D	<i>vt1c, E-hlyA</i>
	FV18505 (L255-4a)	O8:H30	A	<i>vt2a vt2d</i>
Carnes de importación (n=6)	FV18097 (L84-APTa)	O130:H11	B1	<i>vt1a, vt2a, E-hlyA, subA</i>
	FV18101 (L89-4a)	O178:H19	B1	<i>vt2c</i>
	FV18376 (L172-APTa)	O185:H7	B1	<i>vt2c</i>
	FV18390 (L186-3a)	O88:H25	B1	<i>vt2d, E-hlyA, saa</i>
	FV18601 (L281-APTa)	ONT:H14	A	<i>vt2b</i>
	FV18603 (L281-APTa)	O104:H7	B1	<i>vt1c</i>

Al analizar la distribución de los genes de virulencia de las 51 cepas ECVT, observamos que más del 78,4% eran cepas portadoras del gen *vt2*: 28 cepas (54,9%) eran *vt2*, 12 cepas (23,5%) eran *vt1vt2* y 11 cepas (21,6%) eran *vt1*. El segundo gen más prevalente entre las 51 cepas, después de *vt2*, fue el gen *E-hlyA*, presente en 28 (54,9%) de las mismas. Además, el 25,5% de las cepas eran portadoras del gen *eae*, y entre las 13 cepas *eae* positivas se detectaron 4 tipos/subtipos de intiminas (α 1, β 1, γ 1, ζ 1). Por último, los genes presentes con menor prevalencia fueron: *saa* (6 cepas; 11,8%), *subA* (5 cepas; 9,8%) y *stcE* (6 cepas; 11,8%) (Tabla 69).

Tabla 69. Prevalencias de los genes de virulencia presentes en las 51 cepas ECVT aisladas en este estudio

Muestras/Nº cepas	<i>vt1</i>	<i>vt2</i>	<i>vt1vt2</i>	<i>eae</i>	<i>E-hlyA</i>	<i>saa</i>	<i>subA</i>	<i>stcE</i>
Carne de vacuno/n=22	5 22,7%	12 54,5%	5 22,7%	8 36,4%	15 68,2%	5 22,7%	4 18,2%	5 22,7%
Carne de porcino/n=13	2 15,4%	7 53,8%	4 30,8%	3 23,1%	5 38,5%	0 0%	0 0%	1 7,7%
Carne de ave/n=2	1 50%	1 50%	0 0%	1 50%	1 50%	0 0%	0 0%	0 0%
P. agrícolas/n=2	0 0%	1 50%	1 50%	1 50%	1 50%	0 0%	0 0%	0 0%
P. lácteos/n=6	2 33,3%	3 50%	1 16,7%	0 0%	4 66,7%	0 0%	0 0%	0 0%
C. de importación/n=6	1 16,7%	4 66,7%	1 16,7%	0 0%	2 33,3%	1 16,7%	1 16,7%	0 0%
TOTAL/n=51	11 21,6%	28 54,9%	12 23,5%	13 25,5%	28 54,9%	6 11,8%	5 9,8%	6 11,8%

Encontramos una asociación positiva entre el gen *eae* y los genes *vt1*, *E-hlyA* y *stcE*:

- El gen *eae* fue significativamente más frecuente entre cepas *vt1* (7/11; 63,6%) que entre las cepas *vt2* (3/28; 10,7%) y *vt1vt2* (3/12; 25%) ($p=0,003$).
- El gen *eae* fue significativamente más frecuente entre cepas positivas para la enterohemolisina (12/28; 42,8%) que entre las cepas *E-hlyA* negativas (1/23; 4,3%) ($p=0,002$).
- Todas las cepas *stcE* positivas eran portadoras del gen *eae* ($p<0,05$).

Finalmente, el gen *saa* que codifica para la adhesina autoglutinante Saa, descrita en cepas ECVT que no poseen la isla de patogenicidad LEE (Paton *et al.* 2001), se detectó en 6 cepas *eae* negativas; y el gen *subA*, codificador de la citotoxina subtilasa, se detectó únicamente en 5 cepas *eae* negativas (incluidas 2 portadoras del gen *saa*).

En el estudio llevado a cabo por Martin y Beutin (2011) se analizaron los genes *vt*, *eae* y *E-hlyA* de 593 cepas ECVT procedentes de muestras de alimentos de origen animal. Los autores encontraron unas prevalencias muy similares de los tipos *vt1*, *vt2*, *vt1vt2* (19,7%; 58,5% y 20,6%, respectivamente). Sin embargo, en nuestro estudio hemos encontrado una prevalencia superior del gen *E-hlyA* (54,9% vs. 37,9%), y significativamente superior en el caso del gen *eae* (25,5% en nuestro estudio vs. 2,2%). La prevalencia del gen *eae* en nuestro estudio está relacionada con la elevada detección de cepas ECVT O157:H7 y O26:H11, puesto que 8 de las 13 cepas *eae* positivas pertenecían a estos serotipos (15,7% de las 51 cepas ECVT aisladas vs. 0,7% de las 593 cepas ECVT del estudio de Martin y Beutin, 2011).

Tipado de verotoxinas

Como se comentó en el apartado 1.3.2.5. de la Introducción (página 32), la familia VT se clasifica en dos tipos claramente diferenciados desde el punto de vista inmunológico y molecular: VT1 y VT2. El tipo VT1 es altamente homogéneo y se clasifica en 3 subtipos (VT1a, VT1c y VT1d), mientras que VT2 presenta mayor heterogeneidad e incluye 7 subtipos (VT2a– VT2g) (Scheutz *et al.* 2012). En el presente estudio, hemos detectado los 7 subtipos *vt2* y 2 subtipos *vt1* (*vt1a* y *vt1c*) con un total de 15 combinaciones de subtipos

vt1 vt2 (Tabla 70). Los subtipos más prevalentes fueron *vt1a* (16 cepas; 31,4%), *vt2a* (13 cepas; 25,5%) y *vt2c* (11 cepas; 21,6%). Precisamente, las cepas ECVT portadoras de los subtipos *vt1a*, *vt2a*, *vt2c* y *vt2d* están asociadas con síntomas clínicos más graves (Friedrich *et al.* 2003; Jelacic *et al.* 2003; Bielaszewska *et al.* 2013). En nuestro estudio, el 62,7% (35 cepas de las 51) eran positivas para *vt1a*, *vt2a*, *vt2c* o *vt2d* (solos o en combinación). Adicionalmente, 9 cepas eran positivas para *vt1c* y/o *vt2b*, subtipos asociados principalmente con procesos diarregénicos. Finalmente, determinamos los subtipos *vt2e* (6 cepas), *vt2f* (1 cepa) y *vt2g* (1 cepa, también positiva para el subtipo *vt2a*).

VT2e se ha asociado con la enfermedad de los edemas en el ganado porcino, pero no se ha encontrado asociación con patología humana (Beutin *et al.* 2008); en nuestro estudio, las 6 cepas *vt2e* positivas, aisladas de 5 muestras de carne picada de cerdo y 1 muestra de pechuga de pollo (probable contaminación cruzada de origen porcino), no presentaban factores de virulencia adicionales.

El subtipo VT2f es uno de los últimos descritos en la literatura, ligado a cepas aisladas de aves (palomas) (Schmidt *et al.* 2000), y aunque inicialmente se habían reportado solo algunos casos aislados de patología humana ligados a ECVT VT2f en Japón (Seto *et al.* 2007; Etoh *et al.* 2009), otros países como Alemania (Prager *et al.* 2009) y Dinamarca (Friesema *et al.* 2014), sugieren que podrían estar ante patógenos emergentes. Concretamente, Prager y colaboradores (2009) identificaron 32 casos *vt2f* aislados entre 2004-2007 pertenecientes a varios serotipos, incluidas cepas O145:H34 asociadas a casos de diarrea en seres humanos. En nuestro estudio, 1 cepa aislada de una muestra de lechuga O145:H34 es portadora además del gen *eae*, al igual que algunas de las descritas en el estudio de Prager y colaboradores (2009). En Dinamarca, Friesema y colaboradores (2014) detectaron 351 infecciones por ECVT no O157, de las que 87 (24,8%) estaban asociadas a cepas *vt2f* pertenecientes a 11 serotipos. Y aunque, entre los 11 serotipos no encontraron el O145:H34, 84 de las 87 cepas *vt2f* (97%) eran positivas para el gen *eae* y negativas para *E-hlyA*, perfil que coincide con nuestra cepa O145:H34 *vt2f*.

Leung y colaboradores (2003) describieron una nueva variante, el subtipo *vt2g*, en una cepa aislada de heces de ganado vacuno sano. Posteriormente, muchos trabajos de diferentes países han referenciado la presencia de cepas *vt2g* aisladas de fauna silvestre,

alimentos, aguas superficiales y residuales (Stephan *et al.* 2008; Prager *et al.* 2011; Mora *et al.* 2012). Prager y colaboradores (2011) compararon en su estudio 12 cepas ECVT *vt2g* aisladas de pacientes con diarrea, fiebre y dolor abdominal, aisladas en Alemania entre 1999-2008, incluida 1 cepa ONT:H16 con el mismo perfil *vt* que la aislada de carne picada de vacuno en nuestro estudio (positiva para *vt2a* + *vt2g*).

En conclusión, 45 de las 51 cepas (88,2%) ECVT de nuestro estudio eran portadoras de genes que codifican subtipos potencialmente patógenos para los humanos (*vt1a*, *vt1c*, *vt2a*, *vt2b*, *vt2c*, *vt2d*, *vt2g*, *vt2f*), solos o en combinación; 35 de las cuales (68,6%) presentaban genes *vt* asociados a síntomas más graves (*vt1a*, *vt2a*, *vt2c*, *vt2d*) (Tabla 70).

Tabla 70. Subtipos de genes *vt* detectados y prevalencias

Subtipo <i>vt</i>	Nº cepas y prevalencia (n=51)
<i>vt1a</i>	16 (31,4%)
<i>vt1c</i>	7 (13,7%)
<i>vt2a</i>	13 (25,5%)
<i>vt2b</i>	5 (9,8%)
<i>vt2c</i>	11 (21,6%)
<i>vt2d</i>	7 (13,7%)
<i>vt2e</i>	6 (11,8%)
<i>vt2f</i>	1 (2%)
<i>vt2g</i>	1 (2%)
Perfil de virulencia	Nº cepas y prevalencia (n=51)
<i>vt1a vt2a</i>	4 (7,8%)
<i>vt1a</i>	7 (13,7%)
<i>vt2a</i>	5 (9,8%)
<i>vt1a vt2a vt2d</i>	1 (2%)
<i>vt2a vt2d</i>	2 (3,9%)
<i>vt2a vt2g</i>	1 (2%)
<i>vt1c vt2b</i>	3 (5,9%)
<i>vt1c</i>	4 (7,8%)
<i>vt2b</i>	2 (3,9%)
<i>vt1a vt2c</i>	3 (5,9%)
<i>vt2c</i>	8 (15,6%)
<i>vt1a vt2d</i>	1 (2%)
<i>vt2d</i>	3 (5,9%)
<i>vt2e</i>	6 (11,8%)
<i>vt2f</i>	1 (2%)

Al igual que otros autores (Martin y Beutin, 2011; Bai *et al.* 2015), hemos encontrado ciertas asociaciones entre subtipos *vt* y el tipo de alimento de aislamiento de la cepa. Así, los subtipos *vt1c* y *vt2b* eran significativamente más prevalentes entre las cepas de origen ovino (productos lácteos de leche cruda + carnes de importación); específicamente, *vt1c* estaba presente en el 50% en cepas ovinas vs. 6,9% en cepas de otros orígenes ($p=0,008$) y

vt2b en el 37,5% de las cepas ovinas vs. 4,6% de otros orígenes ($p=0,023$). También hemos encontrado asociación entre el subtipo *vt2e* y el origen porcino, ya que 5 de las 6 cepas *vt2e* de nuestro estudio eran de ese origen, a la otra cepa aislada de pechuga de pollo se le presupone una contaminación cruzada. Sin embargo, y a diferencia de Bai y colaboradores (2015), que encontraron que todas las cepas ECVT aisladas de carne de cerdo en su estudio (14 cepas) eran portadoras de este *vt2e*, o Martin y Beutin (2011) que detectaron este subtipo en el 75,9% de las cepas de carne de cerdo, nosotros lo hemos detectado en el 38,5% (5 de 13) de las cepas de carne picada de cerdo, lo que podría sugerir contaminación cruzada con otras carnes en el momento de la manipulación en el picado de las mismas. Por último, a diferencia de Martin y Beutin (2011), no hemos encontrado asociación significativa de *vt1a*, *vt2a* o *E-hlyA* con algún tipo específico de muestra.

Tipado de Intiminas

La región variable C-terminal codificada en el gen *eae* define del orden de 34 tipos y subtipos de intiminas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ , $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, $\epsilon 5$, $\zeta 1$, $\zeta 2$, $\zeta 3$, ν , $\eta 1$, $\eta 2$, $\theta 1$, $\theta 2$, $\iota 1A$, $\iota 1B$, $\iota 1C$, $\iota 2$, υ , κ , λ , μ , \omicron , π , τ , ρ , σ) asociadas con un tropismo tisular específico (Phillips y Frankel, 2000).

En nuestro estudio las 13 cepas ECVT *eae* positivas presentaron 4 subtipos ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$, $\zeta 1$) con asociaciones específicas: el subtipo $\beta 1$ asociado a las 4 cepas O26:H11, y el subtipo $\gamma 1$ asociado a las 4 cepas O157:H7; el subtipo $\zeta 1$ lo detectamos en 4 cepas pertenecientes a serotipos (O150:H2, O156:H25, ONT:H2, ONT:H28) no asociados a infección humana (seropatotipo D); por último, el subtipo $\alpha 1$ lo detectamos en 1 cepa del serotipo O145:H34. Curiosamente, el subtipo $\alpha 1$ no lo habíamos detectado en ninguna de las 722 cepas ECVT aisladas de diferentes orígenes de un estudio previo, incluidas 122 no O157 *eae* positivas (Mora *et al.* 2005).

4.2.4. Grupos filogenéticos de las cepas ECVT

Estudios previos indican que las cepas ECVT se engloban, fundamentalmente, en el grupo filogenético B1, y muy pocas cepas pertenecen al grupo B2; los grupos filogenéticos A y D representan, aproximadamente, el 20 y 10%, respectivamente (Donnenberg y Whittam, 2001; Escobar-Páramo *et al.* 2004; Girardeau *et al.* 2005). En concordancia con lo indicado

en dichas publicaciones, el filogrupo B1 fue el más prevalente entre las 51 cepas ECVT de nuestro estudio (64,7%), seguido del filogrupo A (19,6%), D (9,8%) y B2 (5,9%) (Tabla 68).

Por tanto, la mayoría de las cepas del estudio (43 de 51 cepas; 84,3%) serían B1 o A; el filogrupo D estaría representado, fundamentalmente, por las cepas ECVT O157 (4 de las 5 cepas del filogrupo D); por último, las 3 cepas del filogrupo B2 pertenecían a 2 serotipos (1 cepa O145:H34; 2 cepas O166:H28).

4.2.5. Patrones de resistencia de las cepas ECVT

El estudio de sensibilidad a los antimicrobianos de las 51 cepas ECVT se realizó en la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) mediante el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 Plus. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las siguientes familias y grupos de antimicrobianos: penicilinas, cefalosporinas (incluidas de espectro extendido), inhibidores de betalactamasas, cefamicinas, carbapenemas, aminoglicosidos, quinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol y fosfomicina.

Quince (29,4%) de las 51 cepas ECVT eran resistentes a al menos 1 de los antimicrobianos ensayados. Por serotipos, 2 (50%) de las 4 cepas O157:H7 presentaron alguna resistencia y 13 (27,6%) de las 47 no O157 (Tabla 71).

Tabla 71. Prevalencia de resistencias de las cepas ECVT O157 y no O157

Antibiótico	Total cepas n=51	ECVT O157 n=4	ECVT no O157 n=47
SXT	11 (21,6%)	2 (50%)	9 (19,1%)
AMP	4 (7,8%)	1 (25%)	3 (6,4%)
NAL	1 (1,9%)	0 (0%)	1 (2,1%)
IMP	1 (1,9%)	0 (0%)	1 (2,1%)
GEN	1 (1,9%)	0 (0%)	1 (2,1%)
TOB	1 (1,9%)	0 (0%)	1 (2,1%)

SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; AMP: ampicilina; NAL: ácido nalidíxico; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina

No encontramos diferencias significativas entre las cepas *eae* positivas (23%; 3 de 13) y las *eae* negativas (31,6%; 12 de 38); y tampoco entre el tipo de VT, aunque la prevalencia fue superior para las cepas *vt2* (39,3%) con respecto a *vt1* (18,1%) o *vt1vt2* (16,7%). Sin embargo, sí detectamos diferencias significativas con respecto a *E-hlyA*:

14,3% de las cepas *E-hlyA* positivas eran resistentes (4 de 28) frente al 47,8% de las negativas (11 de 23) ($p=0,010$) (Tabla 72).

Tabla 72. Prevalencia de resistencias por antibiótico ensayado en relación con los genes de virulencia

Antibiótico	Nº de cepas resistentes/total investigadas/%																				
	Total			vt 1			vt 2			vt 1 vt 2		<i>eae</i> ⁺		<i>eae</i> ⁻		<i>E-hlyA</i>					
CEF	0	50	0%	0	10	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	12	0%	0	38	0%	0	27	0%
CFZ	0	50	0%	0	10	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	12	0%	0	38	0%	0	27	0%
CXM	0	50	0%	0	10	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	12	0%	0	38	0%	0	27	0%
CTX	0	51	0%	0	11	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	13	0%	0	38	0%	0	28	0%
CAZ	0	51	0%	0	11	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	13	0%	0	38	0%	0	28	0%
FEP	0	51	0%	0	11	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	13	0%	0	38	0%	0	28	0%
FOX	0	50	0%	0	10	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	12	0%	0	38	0%	0	27	0%
AMC	0	51	0%	0	11	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	13	0%	0	38	0%	0	28	0%
TZP	0	51	0%	0	11	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	13	0%	0	38	0%	0	28	0%
IMP	1	51	2%	0	11	0%	1	28	3,6%	0	12	0%	0	13	0%	1	38	2,6%	0	28	0%
AMP	4	51	7,8%	1	11	9,1%	1	28	3,6%	2	12	16,7%	2	13	15,4%	2	38	5,3%	2	28	7,1%
GEN	1	50	2%	0	10	0%	1	28	3,6%	0	12	0%	0	12	0%	1	38	2,6%	0	27	0%
TOB	1	50	2%	0	10	0%	1	28	3,6%	0	12	0%	0	12	0%	1	38	2,6%	0	27	0%
NAL	1	51	2%	0	11	0%	1	28	3,6%	0	12	0%	0	13	0%	1	38	2,6%	0	28	0%
CIP	0	51	0%	0	11	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	13	0%	0	38	0%	0	28	0%
SXT	11	51	21,6%	2	11	18,2%	8	28	28,6%	2	12	16,7%	3	13	23,1%	9	38	23,7%	3	28	10,7%
FOF	0	51	0%	0	11	0%	0	28	0%	0	12	0%	0	13	0%	0	38	0%	0	28	0%

CEF: cefalotina, CFZ: cefazolina, CXM: cefuroxima, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, FOX: ceftaxina, AMC: amoxicilina/clavulánico, TZP: piperacilina/tazobactam, IMP: imipenem, AMP: ampicilina, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, FOF: fosfomicina

Por antimicrobianos, la resistencia frente al trimetoprim-sulfametoxazol fue la más prevalente (21,6%; 11 de las 51 cepas), seguida de la ampicilina (7,8%; 4 de 51 cepas); el resto de resistencias frente al ácido nalidíxico, imipenem, gentamicina y tobramicina, se detectaron en 1 cepa (Tabla 72). Globalmente, las 15 cepas resistentes presentaron 6 patrones de resistencia frente a 1 o 2 antimicrobianos. No detectamos ninguna cepa resistente a cefalosporinas, inhibidores de las bctalactamasas, cefamicinas, fluoroquinolonas o a la fosfomicina, aunque 5 cepas no O157 (2 aisladas de carne de cerdo, 1 de carne de ave, 1 de productos lácteos y 1 de carne de importación) presentaron un valor de CMI intermedio para la cefalotina.

Por tipo de muestra, la mayor prevalencia de resistencias la detectamos entre las cepas aisladas de carne picada de cerdo (53,8%; 7 cepas procedentes de 7 muestras), seguida

de las de carne de ave (50%; 1 cepa), y las de carne picada de vacuno (31,8%; 7 cepas procedentes de 5 muestras) (Tabla 73).

Tabla 73. Origen, serotipo y perfil de resistencia de las 15 cepas ECVT resistentes

Tipo de alimento	Serotipo	Perfil de resistencia
Carne vacuno	ONT:H21	SXT
	O91:H21	SXT
	O174:H21	SXT
	O157:H7	SXT
	O174:H21	SXT
	O174:H21	SXT
	O156:H25	AMP
Carne de cerdo	*ONT:HNM	AMP/SXT
	O106:H21	SXT
	O8:H8	NAL/SXT
	O8:H8	IPM
	O8:H19	SXT
	O157:H7	AMP/SXT
Carne de ave	O168:H21	AMP
	ONT:HNM	GEN/TOB

SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; AMP: ampicilina; NAL: ácido nalidixico; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina;
 *Esta cepa presentó un valor de CMI intermedio para la cefalotina

En un estudio previo sobre 722 ECVT aisladas de diferentes orígenes (humano, bovino, ovino y alimentos), observamos que globalmente el 41% de las cepas O157 y el 41% de las no O157 eran resistentes a al menos alguno de los 26 antimicrobianos ensayados, y que el porcentaje era más elevado en el caso de las 65 cepas aisladas de carne de vacuno adquirida también en establecimientos de la ciudad de Lugo (57% de las cepas O157 y 55% de las no O157) (Mora *et al.* 2005). Si comparamos los datos del presente estudio para los antimicrobianos utilizados en ambos ensayos, detectamos, fundamentalmente, diferencia en la resistencia frente a la ampicilina y las cefalosporinas. En el estudio previo el valor frente a la ampicilina era del 16% de las 58 cepas ECVT no O157 aisladas de carne de vacuno, en nuestro estudio es del 6,4% (3 de las 47 cepas no O157) y en el caso de carne picada de vacuno 5,3% (1 cepa de 19 no O157). Por otro lado, en el estudio anterior se detectaron cepas resistentes para cefalosporinas de 1ª y 2ª generación (12% frente a cefalotina, 3% cefazolina y 2% cefuroxima), frente al 0% del presente estudio (ninguna de las 51 cepas ECVT), aunque aquí habría que tener en cuenta las 5 cepas ECVT no O157 con resistencia intermedia a la cefalotina (5 cepas de 47; 10,6%).

Curiosamente, en el estudio de Ju y colaboradores (2012) realizado en Washington, en el que analizaron la sensibilidad de 32 cepas ECVT no O157 aisladas de carne picada de vacuno y cerdo (16 y 16, respectivamente), ninguna de ellas presentó resistencia frente al trimetoprim-sulfametoxazol, a la ampicilina o la gentamicina (vs. 19,1%, 6,4% y 2,1%, respectivamente, de las ECVT no O157 de nuestro estudio). Por el contrario, detectaron un 12,5% de cepas resistentes al ácido nalidíxico (2,1% en nuestro estudio). Además, y a diferencia de Ju y colaboradores (2012), no hemos detectado diferencias significativas entre el número de cepas resistentes aisladas de carne picada de cerdo y de vacuno (7 en ambos casos, $p=0,17$).

4.2.6. Perfiles de macrorrestricción obtenidos por PFGE de las cepas ECVT. Comparación con cepas de origen humano

Se llevó a cabo la técnica de PFGE, de acuerdo con el protocolo estandarizado de PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>), con objeto de definir los perfiles de macrorrestricción obtenidos con la enzima *Xba*I de las 51 cepas ECVT de nuestro estudio. Las imágenes de los geles de PFGE fueron analizadas con el programa BioNumerics versión 5.0. para obtener el dendrograma que se muestra en la Figura 35.

Las 51 cepas ECVT del presente estudio revelaron un total de 50 perfiles de macrorrestricción. La alta diversidad genética detectada mediante PFGE está en correlación con la heterogeneidad de serotipos (35 distintos) y perfiles de genes de virulencia (15 combinaciones *vt*). En general, las cepas del mismo serotipo se agruparon próximas en el dendrograma, con la excepción de las cepas O104:H7, O113:H21 y O178:H19 (2 cepas, respectivamente) que presentaban perfiles de genes de virulencia diferentes, y 1 cepa O8:H9.

Únicamente 3 pequeños cluster, de 2 cepas cada uno, presentaron una similitud >85% (serotipos O8:H9, O174:H21, O157:H7), y solo el cluster de 2 cepas O8:H9-A *vt*2e procedentes de 2 muestras de carne picada de cerdo mostraba perfiles PFGE idénticos. Estas 2 muestras de carne picada fresca habían sido muestreadas el mismo día, pero de 2 establecimientos comerciales diferentes, lo que podría indicar un mismo suministrador (matadero o granja).

Las 2 cepas O174:H21-B1 *vt2c* (88,9% identidad) procedían de 2 productos de vacuno distintos (carne picada envasada tipo burger y carne picada envasada), pero muestreados el mismo día y en un mismo establecimiento, lo que indicaría mismo origen de contaminación. El hecho de que la tercera cepa del estudio O174:H21-B1 *vt2c*, procedente de una muestra de carne de vacuno picada envasada y obtenida de otro establecimiento de la misma cadena comercial una semana después, mostrase una identidad del 80,6% con las 2 anteriores, sugeriría que un punto de contaminación común podría ser granja o matadero, y no la manipulación en el propio establecimiento.

Curiosamente, las 2 cepas O157:H7-D *vt2c eae-γ1 E-hlyA stcE* (87,8% de identidad), aisladas de 2 muestras de carne de vacuno (1 de carne de vacuno picada fresca y otra de carne de vacuno picada envasada), procedían de 2 cadenas comerciales diferentes y fueron muestreadas en meses distintos; el origen de la contaminación podría estar en el matadero, compartido por ambas cadenas comerciales, o que las cabezas de ganado procediesen de la misma explotación ganadera. Aunque las otras 2 cepas O157:H7-D *vt1a vt2c eae-γ1 E-hlyA stcE* aisladas en este estudio (1 de carne de vacuno y 1 de carne de cerdo) se agrupan con las anteriores, presentaron una identidad de tan solo 69,3%; la cepa de vacuno tipo burger 43-1a había sido muestreada el mismo día y en el mismo establecimiento que la 46-4a. Hemos constatado en estudios anteriores la diversidad genética del grupo clonal ECVT O157-D en cepas aisladas en la misma zona geográfica, ya sea de alimentos (Mora *et al.* 2007b), de canales en matadero (Alonso *et al.* 2007) o de otros orígenes (Mora *et al.* 2004). En el estudio de Alonso y colaboradores (2007) sobre la detección de portadores de ECVT O157 en matadero, aislaron hasta 4 cepas diferentes en un mismo individuo (3 cepas distintas de contenido fecal y 1 aislada de la canal); además, los autores demostraron la utilidad de la herramienta PFGE en los programas de APPCC para la detección de contaminación cruzada, al identificar cepas aisladas de la muestra fecal de un animal y su canal con el mismo perfil que las aisladas de dos canales de animales sacrificados en el mismo día.

Como conclusión, los resultados de PFGE revelaron que existe una alta diversidad genética entre las cepas ECVT aisladas de alimentos, y que esta herramienta de tipificación podría ser utilizada en la identificación de fuentes de contaminación.

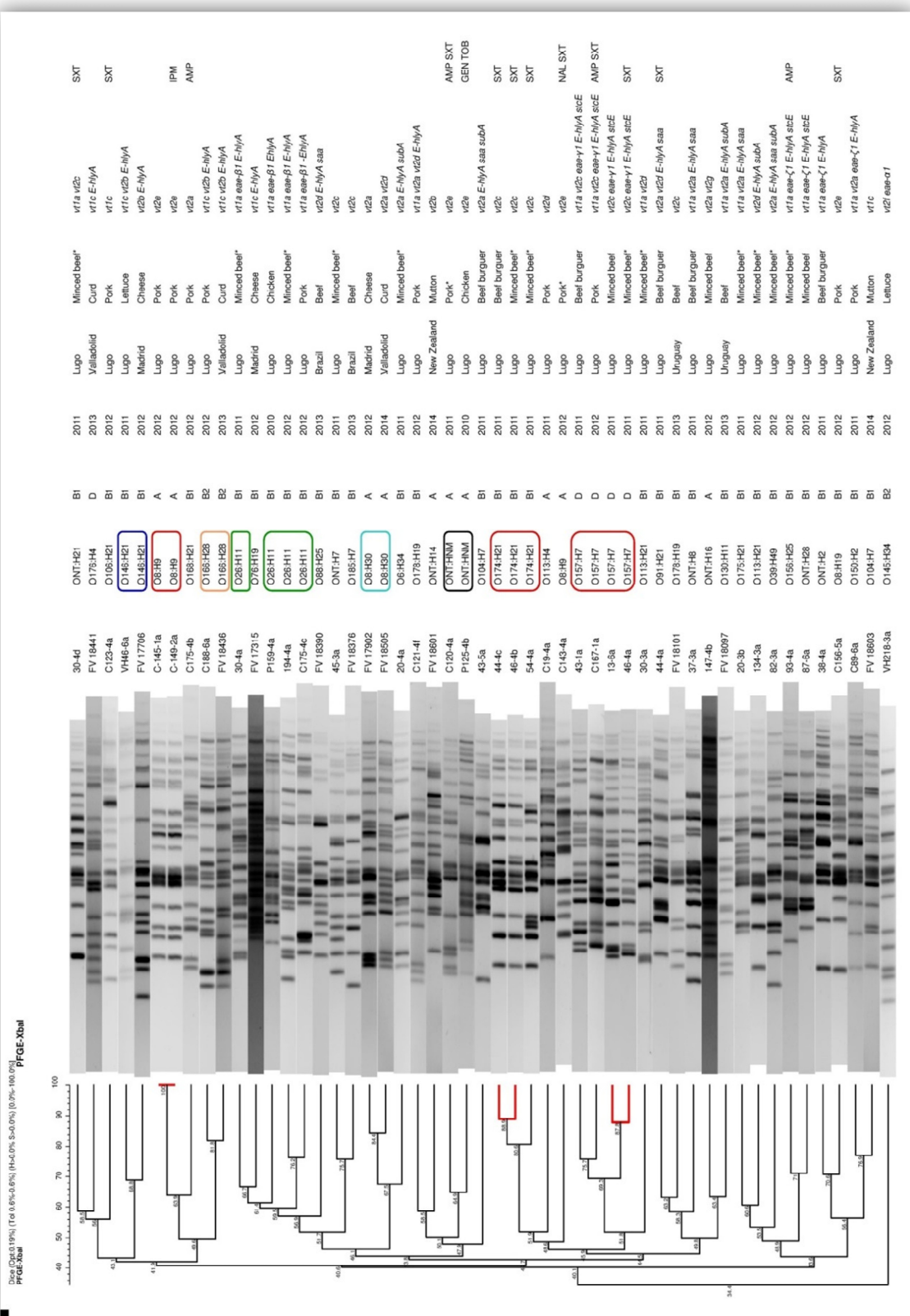


Figura 35. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 51 cepas ECVT del presente estudio. A la derecha del dendrograma figuran los códigos de cepa, serotipos, grupos filogenéticos, año de aislamiento, origen geográfico, tipo de muestra (*envasado en atmósfera modificada), genes de virulencia y patrones resistencias

Estudio comparativo con cepas ECVT de otros orígenes

Con objeto de analizar similitudes y diferencias entre cepas pertenecientes a los mismos serotipos, pero aisladas de diferentes orígenes, comparamos las cepas ECVT de este estudio con otras de nuestra colección (140 cepas O26:H11, 29 cepas O76:H19, 13 cepas O113:H21, 121 cepas O146:H21, 22 cepas O156:H25, 297 cepas O157:H7 y 43 cepas O166:H28). La Figura 36 muestra el dendrograma con las 25 cepas que mostraron mayor similitud en dicho análisis.

La comparación de las 4 cepas **O157:H7** aisladas de alimentos en el presente estudio (3 de carne de vacuno y 1 de carne de cerdo) con 297 cepas de nuestra colección, dio como resultado un cluster de 10 cepas (>85% similitud), que incluía la cepa de carne de vacuno 46-4a y otras 9 aisladas de 3 casos de patología humana, 1 portador bovino y 1 ovino sano, y 4 de leche de oveja. El perfil de genes de virulencia de las cepas era similar (la mayoría *vt2c eae-γ1 E-hlyA stcE*), aunque algunas cepas habían perdido el gen *vt2c*. Este resultado reforzaría la hipótesis del potencial patógeno de la cepa aislada en este estudio de la muestra de carne de picada de vacuno envasada (no solo por pertenecer al seropatotipo A, sino también por su alta similitud con cepas aisladas de pacientes humanos) (Figura 36). Ya habíamos demostrado en un estudio previo, la implicación de carne de vacuno en la transmisión de una cepa ECVT O157 en un caso de colitis hemorrágica, al obtener un perfil PFGE idéntico de las cepas aisladas del paciente, de un familiar portador y de una muestra de carne de vacuno consumida por dicho paciente (Mora *et al.* 2011b).

Al comparar las 4 cepas **O26:H11** del presente estudio (2 de carne de vacuno, 1 de carne de cerdo y 1 de carne de ave) con 140 cepas O26:H11/HNM de nuestra colección, detectamos un alto grado de similitud (>85%) entre la cepa aislada de pechuga de pollo P159-4a, 2 cepas implicadas en patología humana y 3 cepas de origen vacuno (heces y carne); además, las 5 cepas presentaban el mismo perfil de genes de virulencia (*vtx1a eae-β1 E-hlyA*). Este resultado sugeriría que la cepa aislada en este estudio de la carne de pollo tendría un probable origen bovino, y reforzaría la hipótesis de su potencial patógeno (no solo por pertenecer al seropatotipo B, sino también por su alta similitud con cepas aisladas de pacientes humanos) (Figura 36).

Comparamos también la cepa **O146:H21** aislada de una muestra de lechuga VH46-6a en el presente estudio con 121 cepas O146:H21/HNM de nuestra colección, incluidas cepas aisladas de pacientes humanos. No encontramos ningún cluster de similitud $\geq 85\%$, pero la cepa aislada de lechuga mostró un 83,9% de identidad con 1 cepa de origen humano implicada en diarrea. Además, presentaba similitud con cepas de origen ovino y caprino; en el dendrograma se muestra una cepa aislada de heces de cabra con 75,6% de identidad. Las cepas presentaban idéntico perfil de genes de virulencia (*vt1c vt2b E-hlyA*) (Figura 36).

La comparación de las 2 cepas **O166:H28** aisladas en el presente estudio de 1 muestra de producto lácteo y 1 de carne picada de cerdo con 43 cepas O166:H28 de nuestra colección, incluidas cepas humanas, dio como resultado un cluster $>85\%$ de la cepa aislada del producto lácteo FV 18436 con 6 cepas de origen ovino (4 de leche de oveja y 1 de heces de portador sano) y bovino (1 de heces de portador sano). Todas las cepas de este cluster presentaban el mismo perfil de genes de virulencia (*vt1c vt2b E-hlyA*) (Figura 36). La otra cepa O166:H28 aislada de carne de cerdo en este estudio C188-6a presentó una identidad $<80\%$ con las anteriores (dato no mostrado).

Finalmente, comparamos también las cepas O76:H19, O113:H21 y O156:H25 aisladas de alimentos en este estudio con otros orígenes, pero resultaron ser muy diferentes (datos no mostrados).

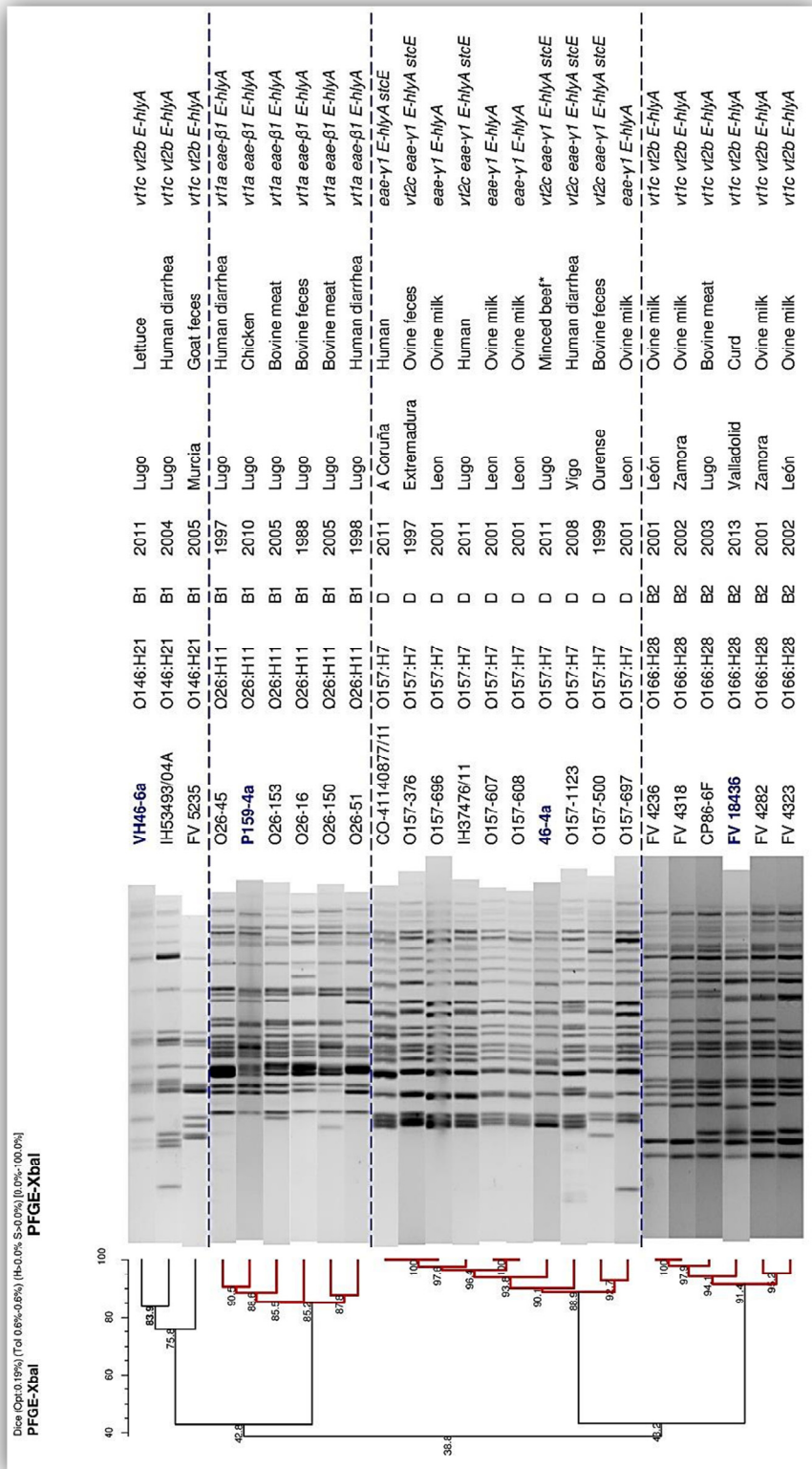


Figura 36. Dendrograma comparativo de los perfiles de PFGE de 4 cepas ECVT del presente estudio con cepas de otros orígenes. A la derecha del dendrograma figuran los códigos de cepa, serotipos, grupos filogenéticos, año de aislamiento, origen geográfico, tipo de muestra (* envasado en atmósfera modificada), genes de virulencia. Las cepas aisladas de alimentos en este estudio figuran en azul

4.2.7. Evaluación de protocolos de detección y aislamiento de ECVT en alimentos

Los patógenos transmitidos por alimentos, como es el caso de los ECVT, se encuentran presentes en la mayoría de las ocasiones en un número muy bajo, lo que dificulta enormemente su recuperación, que se ve afectada además por los factores físicos o químicos debidos a la composición de la matriz alimentaria en sí, y a las condiciones en que se encuentra. Es fundamental, por tanto, tener en cuenta todas estas limitaciones a la hora de diseñar protocolos de detección y aislamiento suficientemente sensibles y específicos.

En el presente estudio hemos aplicado el protocolo diseñado en el LREC para la detección y aislamiento de *E. coli* diarreagénicos a partir de PCR convencional (Tabla 36, página 118). Los resultados obtenidos con nuestro protocolo los comparamos con un segundo procedimiento basado en PCR en tiempo real.

4.2.7.1. Protocolo de detección y aislamiento de ECVT mediante PCR convencional

Como especificamos en la Tabla 36 (página 118), el protocolo aplicado en el presente estudio para la identificación de *E. coli* diarreagénicos consta de 2 métodos: el Método A (A-1 y A-2), diseñado para la detección y aislamiento de ECVT O157, que está basado en la aplicación de técnicas específicas, como la separación inmunomagnética para la captura del antígeno O157, y el uso de medios de aislamiento selectivos; y el Método B (B-3, B-4, B-5 y B-6), diseñado para la detección y aislamiento de los ECVT no O157 y otros *E. coli* diarreagénicos, que se basa en la combinación de medios selectivos y distintas temperaturas de incubación (Tabla 74). Por consiguiente, tras aplicar los 6 métodos, se realiza la detección de los genes de virulencia característicos de los ECVT mediante PCR convencional a partir de confluentes de los cultivos selectivos.

Tabla 74. Métodos aplicados para la detección y aislamiento de ECVT en los 4 grupos de alimentos muestreados

Métodos
(A-1) SIM + agar MACSTC 37 °C/18 h
(A-2) SIM + agar MACS 37 °C/18 h
(B-3) Caldo MacConkey 37 °C/18 h + agar MACL 37 °C/18 h
(B-4) Caldo MacConkey 37 °C/18 h + agar MACSTC 37 °C/18 h
(B-5) Caldo MacConkey 44 °C/18 h + agar MACL 44 °C/18 h
(B-6) Caldo MacConkey 44 °C/18 h + agar MACSTC 44 °C/18 h

Observando los resultados de detección y aislamiento de ECVT en los 4 grupos de alimentos muestreados, pudimos determinar que en la carne de ave (2 muestras positivas y 2 cepas aisladas), las metodologías que presentaron mayor sensibilidad fueron los métodos B-4 y B-6, que mostraron una sensibilidad del 100%, tanto para la detección y aislamiento, como para el número de cepas aisladas. En cuanto a los productos agrícolas (2 muestras positivas y 2 cepas aisladas), el método más sensible resultó ser el B-6, 100% para la detección, aislamiento y número de cepas aisladas.

Para la detección de ECVT en carne de vacuno y cerdo, la metodología que permitió obtener un mayor número de muestras positivas, con una sensibilidad del 75% y 70,6%, respectivamente, fue el método B-4 (Tabla 75 y Tabla 76). De la misma manera, también en ambos alimentos, fue el método B-4 el que permitió obtener un mayor número de muestras con aislamiento de alguna cepa (62,5% y 58,3%, respectivamente). Sin embargo, estos porcentajes, tanto de detección como de aislamiento, son sensiblemente bajos considerando el número total de cepas aisladas en ambos casos, es decir, en el caso de la carne de vacuno, con el método más sensible (B-4), conseguimos aislar tan solo el 59,1% de las cepas (13/22); y en la carne de cerdo el 62% (8/13).

Tabla 75. Sensibilidad de los métodos utilizados para la detección y aislamiento de ECVT en las muestras de carne de vacuno del presente estudio

Métodos	Carne de vacuno				Muestras positivas ^a	Nº de cepas ^d (n=22)
	Detección ^b (n=20)		Aislamiento ^c (n=16)			
A-1. APTvcc 6 h/37 °C + SIM-O157 + agar MACSTC 18 h/37 °C + PCR	1	5%	1	6,3%	43*	1 4,5%
A-2. APTvcc 6 h/37 °C + SIM-O157 + agar MACS 18 h/37 °C + PCR	1	5%	1	6,3%	46*	1 4,5%
B-3. APT 6 h/37 °C + caldo MACL 18h/37 °C + agar MACL 18 h/37 °C + PCR	8	40%	6	37,5%	20*30*37-45-82-134-137-156	6 27,3%
B-4. APT 6 h/37 °C + caldo MACL 18 h/37 °C + agar MACSTC 18 h/37 °C + PCR	15	75%	10	62,5%	20*30*37-38-44**45-46**54-93-137-147-156-177-187-194	13 59,1%
B-5. APT 6 h/37 °C + caldo MACL 18 h/44 °C + agar MACL 18 h/44 °C + PCR	3	15%	2	12,5%	43*134-137	2 9,1%
B-6. APT 6 h/37 °C + caldo MACL 18 h/44 °C + agar MACSTC 18 h/44 °C + PCR	9	45%	5	31,3%	13-20-30-38-44*45-87-93-187	5 22,7%
Combinando A-1, B-4 y B-6	18	90%	13	81,3%	13-20*30*37-38-43*44**45-46**54-87-93-137-147-156-177-187-194	16 72,7%
Combinando A-1, B-3 y B-4	18	90%	14	87,5%	20*30*37-38-43*44**45-46**54-82-93-134-137-147-156-177-187-194	19 86,4%
Combinando A-1, B-3, B-4 y B-6	20	100%	16	100%	13-20*30*37-38-43*44**45-46**54-82-87-93-134-137-147-156-177-187-194	21 95,5%
Combinando A-1, A-2, B-3, B-4, B-5 y B-6	20	100%	16	100%	13-20*30*37-38-43*44**45-46**54-82-87-93-134-137-147-156-177-187-194	22 100%

^aEn **negrilla** figuran las muestras en las que se aislaron ECVT. En **negrilla y subrayado** las muestras de las que se aisló O157:H7.

(***)Muestras de las que se aisló más de una cepa, cada color representa una cepa distinta. ^bReferido al número de muestras con confluente positivo. ^cReferido al número de muestras con confluente positivo de las que se aisló 1 o más cepas. ^dNúmero de cepas diferentes aisladas.

Tabla 76. Sensibilidad de los métodos utilizados para la detección y aislamiento de ECVT en las muestras de carne de cerdo del presente estudio

Métodos	Carne de cerdo				Muestras positivas ^a	Nº de cepas ^d	
	Detección ^b (n=17)		Aislamiento ^c (n=12)			n=13	
A-1- APTvcc 6 h/37 °C + SIM-O157 + agar MACSTC 18 h/37 °C + PCR	2	11,8%	2	16,7%	C145-C167	2	15%
A-2- APTvcc 6 h/37 °C + SIM-O157 + agar MACS 18 h/37 °C + PCR	2	11,8%	1	8,3%	C95-C149	1	8%
B-3- APT 6 h/37 °C + caldo MAACL 18 h/37 °C + agar MAACL 18 h/37 °C + PCR	7	41,2%	1	8,3%	C07-C89-C95-C123-C156-C175-C188	0	0%
B-4- APT 6 h/37 °C + caldo MAACL 18 h/37 °C + agar MACSTC 18 h/37 °C + PCR	12	70,6%	7	58,3%	C19-C27-C72-C89-C120-C121-C123-C143-C145-C149-C175** -C188	8	62%
B-5- APT 6 h/37 °C + caldo MAACL 18 h/44 °C + agar MAACL 18 h/44 °C + PCR	4	23,5%	1	8,3%	C07-C121-C156-C186	1	8%
B-6- APT 6 h/37 °C + caldo MAACL 18 h/44 °C + agar MACSTC 18 h/44 °C + PCR	7	41,2%	5	41,7%	C89-C121-C123-C143-C145-C175-C188	5	38%
Combinando A-1, B-4 y B-6	13	76,5%	10	83,3%	C19-C27-C72-C89-C120-C121-C123-C143-C145-C167-C149-C175** -C188	11	85%
Combinando A-1, B-3 y B-4	16	94,1%	8	66,7%	C07-C19-C27-C72-C89-C95-C120-C121-C123-C143-C145-C149-C156-C167-C175**-C188	9	69%
Combinando A-1, B-3, B-4 y B-6	16	94,1%	10	83,3%	C07-C19-C27-C72-C89-C95-C120-C121-C123-C143-C145-C149-C156-C167-C175**-C188	11	85%
Combinando A-1, B-3, B-4 y B-5	17	100%	9	75%	C07-C19-C27-C72-C89-C95-C120-C121-C123-C143-C145-C149-C156-C167-C175**-C186-C188	10	77%
Combinando A-1, A-2, B-2, B-3, B-4, B-5 y B-6	17	100%	12	100%	C07-C19-C27-C72-C89-C95-C120-C121-C123-C143-C145-C149-C156-C167-C175**-C186-C188	13	100%

^aEn **negrilla** figuran las muestras en las que se aislaron ECVT. En **negrilla y subrayado** las muestras de las que se aisló O157:H7. (***) Muestras de las que se aisló más de una cepa, cada color representa una cepa distinta. ^bReferido al número de muestras con confluente positivo. ^cReferido al número de muestras con confluente positivo de las que se aisló 1 o más cepas. ^dNúmero de cepas diferentes aisladas.

Por otro lado, a pesar de la baja sensibilidad que presentaron algunos métodos de manera individual (tanto en carne de vacuno como en carne de cerdo, los métodos B-3, B-5 y B-6 presentaron una sensibilidad inferior al 50%), observamos que numerosas cepas se aislaron únicamente en alguno de estos métodos, por lo que las habríamos perdido en caso de no aplicarlos. Además, 2 de las 4 cepas ECVT O157 aisladas en este estudio, se detectaron y aislaron exclusivamente con los métodos específicos A-1 y A-2, diseñados para detectar ECVT O157 (Tabla 75 y Tabla 76).

Por tanto, analizando los resultados de los 6 métodos utilizados para conocer la combinación más eficiente posible, observamos que a pesar de obtener combinaciones más reducidas que cubrirían en algunos casos el 100% de las detecciones y/o el 100% de los aislamientos, en algunos casos se perderían cepas. Así, aplicando los métodos A-1, B-3, B-4 y B-6 se habría dejado de recuperar 1 cepa de carne de vacuno (Tabla 75), y en el caso de la carne de cerdo, no se habrían recuperado 3 cepas aplicando A-1, B-3, B-4 y B-5 (Tabla 76).

Como conclusión, y dado que tanto en carne de vacuno como en carne de cerdo, solo combinando los 6 métodos conseguimos detectar el 100% de las muestras positivas y

recuperar el 100% de las cepas, está justificado aplicar el protocolo basado en la combinación de los 6 métodos para garantizar la máxima sensibilidad. La principal limitación de este protocolo es que se trata de un procedimiento laborioso y lento hasta obtener el resultado definitivo (un mínimo de 3 días).

4.2.7.2. Detección de ECVT por PCR en tiempo real vs. PCR convencional

En el presente estudio realizamos una evaluación de la capacidad de 2 kits comerciales de RT-PCR para detectar los tipos/subtipos de verotoxinas (VT1 VT2 VTEC Screening Assay de Applied Biosystems/Life Technologies; y TaqVet™ Pathogenic *E. coli* Screening de Laboratoire Service International) (apartado 3.4.4, páginas 131 y 133). Además, paralelamente al análisis de las muestras de carne picada de vacuno mediante el protocolo basado en PCR convencional, valoramos el kit de Applied Biosystems/Life Technologies.

Al realizar la evaluación de la capacidad de cada kit para detectar los tipos/subtipos de verotoxinas, pudimos observar que ninguno de los 2 kits detectaba todos los subtipos de verotoxinas descritos. Concretamente, el kit de Applied Biosystems no detectaba los subtipos *vt1d*, *vt2d*, *vt2e*, *vt2f* y *vt2g*; y el kit de Laboratoire Service International, no detectaba *vt2f*.

Una vez conocidas las limitaciones de cada kit, utilizamos el kit de Applied Biosystems de RT-PCR para la detección de ECVT en 190 de las 200 muestras de carne picada de vacuno analizadas en este estudio, a partir de una alícuota de muestra tomada directamente de los caldos de APT incubada a 37 °C/24 h, (tal y como indica el protocolo de extracción de muestras del kit PrepSEQ Rapin Spin Sample de dicha casa comercial y el método VTEC_Method_02_Rev0 establecido por el Laboratorio de Referencia Europeo para *E. coli*) (EU-RL, 2013a). Paralelamente, analizamos las mismas muestras aplicando el protocolo del LREC, basado en PCR convencional, con el fin de comparar y evaluar las diferencias en cuanto a sensibilidad y especificidad de ambos, además de establecer el punto de corte (Ct) del kit de RT-PCR utilizado para muestras de carne picada de vacuno.

Conjuntamente, ambos métodos detectaron 20 (10,5%) muestras positivas para ECVT de las 190 analizadas. Por el método del LREC (PCR convencional) se detectaron 19 de las

20 positivas (95%), aunque finalmente se recuperaron colonias en 15 muestras de las 19 positivas. Por el método RT-PCR se detectaron 14 de las 20 positivas (70%), incluida 1 muestra (la muestra 162) que dio negativa por PCR convencional y en la que se trató de buscar colonias en el caldo de APT sin éxito (Tabla 56). Por tanto, se recuperaron colonias de 11 muestras positivas para ambos métodos; adicionalmente de 4 muestras positivas solo para PCR convencional también se consiguió el aislamiento de las colonias.

Tabla 77. Muestras positivas para ECVT por PCR convencional y RT-PCR

Muestras	^a Ct		^a Ct		Detección PCR Convencional ^d	Subtipos VT	
	<i>vt1</i> ^b	IPC	<i>vt2</i> ^b	IPC		VT1	VT2 ^c
13	35,238	30,047	35,52	31,444	<i>vt2</i> (O157:H7)	-	<i>c</i>
20	22,589	29,789	25,98	31,53	<i>vt1vt2</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
30	23,954	28,243	29,505	29,666	<i>vt1vt2</i>	<i>a</i>	<i>d/c</i>
37	23,923	28,453	24,848	28,354	<i>vt1vt2</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
38	27,053	28,161	31,521	28,245	<i>vt1</i>	<i>a</i>	-
43	28,079	28,880	21,030	28,924	<i>vt1, vt2</i> (O157:H7)	<i>a</i>	<i>c/a</i>
44	34,340	29,479	16,522	28,981	<i>vt2</i>	-	<i>a/d/c</i>
45	30,091	28,438	20,826	28,341	<i>vt2</i>	-	<i>c</i>
46	31,740	28,048	20,798	27,692	<i>vt2</i> (O157:H7)	-	<i>c</i>
54	30,387	29,200	20,865	28,698	<i>vt2</i>	-	<i>c</i>
82	40,2	28,867	29,016	28,746	<i>vt2</i>	-	<i>a</i>
87	38,216	29,916	No amp.	29,974	<i>vt1</i>	<i>a</i>	-
134	40,792	29,378	16,42	29,645	<i>vt2</i>	-	<i>d</i>
137	39,856	29,446	29,581	29,958	<i>vt2</i>	No localizadas	
147	31,665	28,986	36,174	29,603	<i>vt2</i>	-	<i>a/g</i>
156	40,949	29,664	25,185	29,618	<i>vt2</i>	No localizadas	
162	38,465	30,182	28,177	30,700	negativo	No localizadas	
177	39,283	28,965	40,336	29,384	<i>vt1</i>	No localizadas	
187	37,201	28,335	39,718	28,694	<i>vt2</i>	No localizadas	
194	36,797	30,619	40,972	29,829	<i>vt1</i>	<i>a</i>	-

^aCt<28 = positivo; Ct>31 = negativo. ^bSombreadas las casillas en las que hubo discrepancia con el resultado por PCR convencional; ^cEn rojo los subtipos *vt2* no detectables mediante RT-PCR; ^dEn azul figuran las muestras positivas para detección y aislamiento exclusivamente por PCR convencional

Las discrepancias observadas entre ambos métodos se deben al hecho de que, a pesar de que la técnica de RT-PCR es, a priori, más sensible que la PCR convencional, el protocolo aplicado en el LREC supone, como vimos en el apartado anterior, someter a la muestra de alimentos a una serie de procesos selectivos, de manera que cuando se aplica la PCR convencional, la selectividad de los métodos previos compensa la sensibilidad de la RT-PCR (Tabla 36, página 118).

En lo que respecta a los subtipos de verotoxinas, de las 11 muestras positivas para ambos métodos en las que hubo recuperación de cepas, en 10 muestras se identificaron

cepas con subtipos detectables por RT-PCR. Curiosamente, de 1 de las muestras positivas se aisló 1 cepa del subtipo *vt2d* (muestra 134), que no es detectable por el kit de RT-PCR utilizado. La posible explicación de que la muestra fuera positiva por RT-PCR es que en ella estuviera presente, además, otra cepa no aislada de un subtipo detectable, como fue el caso de la muestra 30, de la que se aislaron 2 cepas, 1 *vt2d* (no detectable) y otra *vt2c* (detectable). Por otro lado, no se puede descartar que en las 2 muestras positivas para ECVT por el protocolo del LREC, de las que no se consiguió aislar cepa, y que además resultaron negativas por RT-PCR (muestras 177 y 187), estuviesen presentes cepas de subtipos *vt* no detectables por el kit utilizado.

Es importante señalar la limitación que supone la no detección de algunos subtipos de verotoxinas. En el caso de nuestro estudio, si los resultados hubiesen estado basados en el kit de RT-PCR ensayado, se habrían dejado de dar 10 muestras como positivas (3 *vt2d*, 6 *vt2e* y 1 *vt2f*), incluidas las portadoras de cepas del serototipo C (O113:H21 *vt2d* de 1 muestra de carne picada de vacuno; O8:H19 *vt2e* de 1 muestra de carne picada de cerdo).

Tras evaluar los resultados de las 190 muestras analizadas, establecimos el valor de Ct en $29,5 \pm 1,5$, de esta manera, consideramos positivas todas las muestras cuyo Ct era inferior a 28, y negativas todas aquellas cuyo valor de Ct era superior a 31. Para las muestras con valores entre 28 y 31, fue necesario concentrar la muestra y volver a realizar la RT-PCR. Si el valor de Ct resultaba menor de 28, la muestra se consideraba positiva, pero si se mantenía a pesar de la concentración, se consideraba negativa.

4.3. *E. coli* productoras de BLEE

4.3.1. Prevalencia y tipos

En el presente estudio investigamos la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE de los tipos CTX-M y SHV en alimentos siguiendo el protocolo mostrado en la Tabla 36 (Métodos B-3 a B-6; página 118). Mediante PCR convencional, sobre los confluentes de los medios de cultivo detallados en dicho protocolo, se realizó la detección de los genes *bla*_{CTX-M} en las 950 muestras adquiridas en distintos establecimientos comerciales de la ciudad de Lugo (200 de carne picada de vacuno, 200 de carne picada de cerdo, 200 de pechuga de pollo y 350 productos agrícolas), y *bla*_{SHV} en 500 de esas 950 muestras (200 de carne picada de vacuno, 200 de carne picada de cerdo, 100 de pechuga de pollo).

Para ambos genes, las prevalencias de detección sobre los confluentes fueron muy elevadas. Concretamente para el gen *bla*_{CTX-M} obtuvimos unas prevalencias de 57% para carne de ave, 22,5% para carne picada de vacuno y 22,5% para cerdo; y para el gen *bla*_{SHV}, 47% para carne de ave, 8% para carne de vacuno y 4% para carne de cerdo. Estos resultados no los hemos tomado, no obstante, como significativos, ya que en un número elevado de casos constatamos que las cepas aisladas no eran *E. coli*, sino que se trataba de otras especies bacterianas portadoras de genes BLEE. Por esta razón, en los siguientes apartados consideraremos únicamente los datos de prevalencias basadas en aislamientos confirmados como *E. coli* productoras de BLEE.

Globalmente, 110 muestras de alimentos de las 950 analizadas (11,6%) resultaron positivas para el aislamiento de cepas de *E. coli* productoras de BLEE. En total se aislaron 148 cepas procedentes de los cuatro grupos de alimentos muestreados: carne de vacuno (6 cepas de 5 muestras) (Tabla 78 y Tabla 79); carne de cerdo (13 cepas de 12 muestras) (Tabla 78 y Tabla 80); productos agrícolas (2 cepas de 2 muestras) (Tabla 78 y Tabla 81); y de carne de ave (127 cepas de 91 muestras) (Tabla 78 y Tabla 82). La carne de ave presentó, por tanto, una prevalencia significativamente superior de muestras portadoras de cepas de *E. coli* productoras de BLEE con respecto al resto de alimentos analizados ($p < 0,05$ en todos los casos) (Tabla 78) (Figura 37).

De las 148 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, 114 cepas (77%) eran portadoras del gen *bla*_{CTX-M} exclusivamente, 33 cepas (22,3%) del gen *bla*_{SHV} y 1 cepa (0,7%) era

portadora de ambos genes (Tabla 78).

Tabla 78. Número de cepas y muestras positiva para *E. coli* productoras de BLEE por tipo de alimento

BLEE TIPO	Nº de cepas aisladas/Nº de muestras positivas				TOTAL *n=950
	Carne de vacuno *n=200	Carne de cerdo *n=200	Carne de ave *n=200	P. agrícolas *n=350	
CTX-M	4/3	10/9	98/76	2/2	114/90
SHV	1/1	3/3	29/28**	NR	33/32
CTX-M+SHV	1/1	0	0	NR	1/1
TOTAL BLEE	6/5	13/12	127/91^a	2/2	148/110^a

*n=número de muestras analizadas; **En el caso de carne de ave, solo 100 de las 200 muestras se analizaron para SHV; NR: en el caso de productos agrícolas, no se analizaron para SHV
^aEn 13 muestras se aislaron más de un tipo de cepa, productoras de distintos tipos de BLEE (CTX-M y SHV)

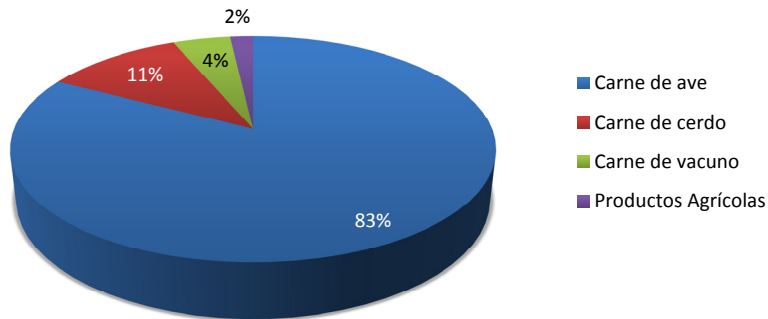


Figura 37. Distribución por tipo de alimento de las 110 muestras con aislamientos positivos de *E. coli* BLEE

Tabla 79. Cepas de E. coli productoras de BLEE aisladas de carne de vacuno (2011-2012)

Serotipo	Nº cepas	Tipado de BLEE	Clonotipo	Perfil de virulencia	Nº de genes	GF	EP	FC	Perfil de Resistencia
O7:H4	1	16,7%	CTX-M-14	CH11-31	<i>fimH iutA iucD iron kpsM II-K1 cvaC traT ibeA tsh</i>	9	A	+	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O8:HNM	1	16,7%	CTX-M-1	CH7-25	<i>fimH iron iss traT</i>	4	A	-	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP SXT
O8:H19	1	16,7%	CTX-M-1	CH65-32	<i>fimH sfa/focDE iutA iucD iss traT</i>	6	B1	+	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN TOB NAL CIP SXT
O21:HNM	1	16,7%	CTX-M-1 SHV-12	CH11-30	<i>fimH iutA iucD kpsM II-K5</i>	4	A	+	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O51:HNM	1	16,7%	CTX-M-1	CH45-97	<i>fimH cnf1 iron iss traT malX</i>	6	D	-	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN TOB NAL
O153:H10	1	16,7%	SHV-12	CH11-54	<i>fimH fimAVM778 traT</i>	3	A	-	CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP
TOTAL	6					5,3		3	

Tabla 80. Cepas de E. coli productoras de BLEE aisladas de carne de cerdo (2011-2012)

Serotipo	Nº cepas	Tipado de BLEE	Clonotipo	Perfil de virulencia	Nº de genes	GF	EP	FC	Perfil de Resistencia
O8:H4	1	7,7%	CTX-M-14	CH45-97	<i>fimH iutA iucD traT malX</i>	5	D	-	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP NIT
O9:H25	1	7,7%	CTX-M-32	CH6-53	<i>fimH fimAVM778</i>	2	B1	-	CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL SXT
O15:HNT	1	7,7%	CTX-M-14	CH41-86	<i>fimH iron iss traT tsh</i>	5	B1	-	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O25:H4	2	15,4%	CTX-M-1	CH40-22	<i>fimH iron kpsM II-K1 iss traT ibeA malX usp</i> <i>fimH iutA iucD iron kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp tsh</i>	8 12	B2 B2	- +	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP
O75:H40	1	7,7%	SHV-12	CH11-137	<i>fimH</i>	1	A	-	CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP
O153:H10	1	7,7%	CTX-M-32	CH11-54	<i>fimH fimAVM778 traT</i>	3	A	-	CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN
O153:HNT	1	7,7%	CTX-M-14	CH4-58	<i>fimH iutA iucD iron kpsM II-K2 cvaC iss traT tsh</i>	9	D	+	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O161:H4	1	7,7%	SHV-12	CH45-97	<i>fimH cdtB iutA iucD iss traT malX</i>	7	D	-	CEF CFZ CXM CAZ FEP AMP SXT
ONT:H4	1	7,7%	CTX-M-1	CH45-97	<i>fimH cdtB iutA iucD iron iss traT malX tsh</i>	9	D	-	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL SXT
ONT:H14	1	7,7%	SHV-12	CH4-31	<i>fimH iutA iucD iron iss traT malX tsh</i>	8	B1	-	CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP
ONT:H40	1	7,7%	CTX-M-9	CH11-137	<i>fimH iron iss traT</i>	4	A	-	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP SXT
ONT:HNM	1	7,7%	CTX-M-1	CH7-470	<i>fimH fimAVM778 tsh</i>	3	A	-	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL
TOTAL	13					5,8		2	

Tabla 81. Cepas de E. coli productoras de BLEE aisladas de productos agrícolas (2011-2012)

Serotipo	Nº cepas	Tipado de BLEE	Clonotipo	Perfil de virulencia	Nº de genes	GF	EP	FC	Perfil de Resistencia
O8:H7	1	50,0%	CTX-M-1	CH19-87	<i>fimH iron iss</i>	3	B1	-	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
ONT:HNM	1	50,0%	CTX-M-1	fumC254	-	0	A	-	CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
TOTAL	2	100,0%				1,5		0	

Tabla 82. Cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de ave (2009-2010)

Serotipo	Nº cepas	Tipado de BLEE	Clonotipo	Perfil de virulencia	Nº de genes	GF	ExpFC	Perfil de Resistencia
O2:H9	1	0,8%	1 CTX-M-14	CH26-270	1 <i>fimH iutA iucD kpsM II-K5 traT</i>	5	D +	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O2:HNM	2	1,6%	1 CTX-M-14	CH39-2	1 <i>fimH fimAVM78 iutA iucD iron kpsM II-K5 cvaC iss traT iubeA malX usp tsh</i>	13	B2 +	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL
			1 CTX-M-9	CH26-270	1 <i>fimH cdtB iutA iucD iron kpsM II-K2 cvaC iss traT tsh</i>	10	D +	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP SXT
O2:H40	2	1,6%	2 CTX-M:NS	NR	2 <i>fimH</i>	1	A -	1 AMP NAL
			3 CTX-M-14	CH632-54	2 <i>fimH fimAVM78 traT</i> 1 <i>fimH fimAVM78</i>	3	A -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O5:H10	2	1,6%	1 CTX-M-1	<i>fumC11</i>	1 <i>iutA iucD iron kpsM II-K5 cvaC iss traT tsh</i>	8	A +	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP SXT
			1 SHV-12	<i>fumC11</i>	1 <i>iutA iucD iron kpsM II-K2 cvaC iss traT tsh</i>	8	A +	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP
O5:H21	1	0,8%	1 CTX-M-9	CH4-121	1 <i>fimH iutA iucD iron cvaC iss traT tsh</i>	8	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O5:H32	1	0,8%	1 SHV-12	CH11-23	1 <i>fimH fimAVM78</i>	2	A -	1 CEF CFZ CXM CTX FOX AMC AMP
O6:H10	1	0,8%	1 SHV-12	CH11-24	1 <i>fimH iutA iucD iss traT</i>	5	A -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN TOB NAL SXT
			3 CTX-M-14	CH11-34	1 <i>fimH fimAVM78 sat iutA iucD iron kpsM III iss</i> 1 <i>fimH fimAVM78 sat iutA iucD iron iss</i> 1 <i>fimH fimAVM78 iutA iucD iron kpsM III iss</i>	8	1	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP SXT
O6:HINT	3	2,4%	1 CTX-M-14	CH11-34	1 <i>fimH fimAVM78 sat iutA iucD iron kpsM III iss</i>	7	A -	2 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
			1 CTX-M-14b		1 <i>fimH fimAVM78 sat iutA iucD iron kpsM III iss</i>	7		
O7:H4	1	0,8%	1 CTX-M-14b	CH11-27	1 <i>fimH iutA iucD kpsM II-K5 iss</i>	5	A +	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP SXT
			1 CTX-M-14	CH4-31	1 <i>fimH malX</i>	2	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O8:H19	3	2,4%	2 CTX-M-1	CH65-32	2 <i>fimH iutA iucD iron iss</i>	5	B1 -	2 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN TOB NAL CIP
			1 SHV-12	CH4-27	1 <i>fimH iutA iucD iron cvaC iss traT tsh</i>	8	A -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP
O8:H21	1	0,8%	1 CTX-M:NS	NR	1 <i>fimH iutA iucD iron cvaC iss</i>	6	B1	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP SXT
O8:HNM	1	0,8%	1 SHV-12	CH4-27	1 <i>fimH iutA iucD iron iss traT tsh</i>	7	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP T2P AMP GEN TOB
			2 CTX-M-1	CH4-32	1 <i>fimH traT</i> 1 <i>fimH</i>	2	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL
O9:H51	2	1,6%	2 CTX-M-9	CH4-121	2 <i>fimH</i>	1	B1 -	2 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP SXT
O9:HNM	1	0,8%	1 CTX-M:NS	NR	1 <i>fimH iutA iucD iron iss malX tsh</i>	7	D -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP
O11:H51	1	0,8%	1 CTX-M-9	CH23-31	1 <i>fimH fimAVM78 usp</i>	3	D -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP TOB NAL CIP SXT
O14:H4	1	0,8%	1 CTX-M-1	CH45-97	1 <i>fimH papef iutA iucD iron iss malX</i>	7	D +	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL SXT

Tabla 82. Continuación

Serotipo	Nº cepas	Tipado de BLEE	Clonotipo	Perfil de virulencia	Nº de genes	GF	EP/EC	Perfil de Resistencia
O15:H10	2	1,6%	2	CTX-M-14	CH29-86 CH41-86	7	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL
O20:H4	1	0,8%	1	CTX-M-9	CH45-97	4	D -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP SXT
O20:H9	1	0,8%	1	CTX-M-14	CH4-24	6	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O20:H10	1	0,8%	1	CTX-M-14	CH4-366	7	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN NAL CIP
O20:H21	1	0,8%	1	SHV-12	CH41-35	7	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP
O21:H16	1	0,8%	1	SHV-12	CH11-47	8	A +	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP
O21:HNT	1	0,8%	1	CTX-M-1	CH11-23	6	A +	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL SXT
O23:HNM	1	0,8%	1	SHV-12	CH11-54	2	A -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP
O25:H4	7	5,5%	7	CTX-M-9	CH40-22	12	B2 +	4 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL SXT 2 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN NAL SXT 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O26:HNM	1	0,8%	1	CTX-M-32	CH276-108	2	D -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN TOB NAL CIP
O34:HNM	1	0,8%	1	CTX-M-1	CH27-27	3	A -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP FOF
O38:H39	1	0,8%	1	CTX-M-1	CH23-221	1	D -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O40:H10	1	0,8%	1	CTX-M-14	CH11-54	3	A -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O40:H48	2	1,6%	2	CTX-M-14	CH11-54	2	A -	2 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O45:H3	1	0,8%	1	CTX-M-1	CH4-26	5	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O45:H8	1	0,8%	1	CTX-M-1	CH41-86	7	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O45:H9	1	0,8%	1	CTX-M-1	CH4-26	5	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O45:HNM	1	0,8%	1	CTX-M-1	CH11-54	2	A -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O51:H4	1	0,8%	1	CTX-M-1	fumC4	3	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMC AMP NAL
O51:H17	1	0,8%	1	CTX-M-1	CH4-32	4	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL
O53:H18	1	0,8%	1	SHV-12	CH11-167	4	A -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP
O55:H14	1	0,8%	1	SHV-12	CH4-31	8	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP
O63:HNT	1	0,8%	1	CTX-M-9	CH31-54	2	D -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL SXT
O68:HNT	1	0,8%	1	CTX-M-14	CH41-35	5	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP FOX AMP NAL CIP NIT
O78:H4	1	0,8%	1	SHV-12	CH45-97	7	D -	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN NAL SXT
O82:H21	2	1,6%	2	CTX-M-14	CH19-469	4	B1 -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O85:H10	1	0,8%	1	SHV-12	CH27-41	7	A -	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN TOB NAL CIP SXT 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL SXT

Tabla 82. Continuación

Serotipo	Nº cepas	Tipado de BLEE	Clonotipo	Perfil de virulencia	Nº de genes	GF	EXPC	Perfil de Resistencia
O86:HNT	1	0,8%	1 CTX-M-1	CH31-54	1	<i>fimH fimAvMT78</i>	1	1 CEF CFZ CXM CTX FEP FOX AMC AMP NAL CIP SXT
O88:HNM	1	0,8%	1 SHV-12	CH153-39	1	<i>fimH traT</i>	1	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL
O91:H4	1	0,8%	1 SHV-12	CH11-30	1	<i>fimH traT</i>	1	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL
O100:HNM	1	0,8%	1 CTX-M-14	CH41-35	1	<i>fimH iutA iucD iron cvaC iss</i>	6	6 B1 - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O103:HNM	1	0,8%	1 SHV-12	CH4-86	1	<i>fimH malX tsh</i>	3	3 B1 - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN NAL
O111:H4	1	0,8%	1 CTX-M-14b	CH45-97	1	<i>fimH iutA iucD iron cvaC iss malX tsh</i>	8	8 D - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL SXT
O115:H2	1	0,8%	1 CTX-M-9	CH29-86	1	<i>fimH iron iss traT</i>	4	4 B1 - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN
O115:H25	1	0,8%	1 CTX-M-NS	NR	1	<i>fimH iutA iucD iron cvaC iss</i>	6	6 B1 - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O115:HNT	1	0,8%	1 CTX-M-14	CH41-35	1	<i>fimH iutA iucD iron iss</i>	5	5 B1 - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O116:H26	1	0,8%	1 SHV-12	CH27-54	1	<i>fimH fimAvMT78 traT</i>	3	3 A - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP
O116:HNT	1	0,8%	1 SHV-12	CH26-65	1	<i>fimH traT</i>	2	2 D - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL
O119:H27	1	0,8%	1 CTX-M-1	CH31-54	1	<i>fimH iutA iucD</i>	3	3 D - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP SXT
O119:HNM	1	0,8%	1 CTX-M-1	CH250-31	1	<i>fimH iutA iucD</i>	3	3 D - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O120:H4	1	0,8%	1 CTX-M-1	CH40-22	1	<i>fimH fimAvMT78 iutA iucD iron kpsM II-K1 iss traT ibeA malX usp tsh</i>	12	12 B2 + 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
O123:H34	1	0,8%	1 SHV-12	CH11-24	1	<i>fimH</i>	1	1 A - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL
O124:HNM	1	0,8%	1 CTX-M-32	CH276-108	1	<i>fimH papEF</i>	2	2 D - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN NAL CIP
O128:H2	1	0,8%	1 CTX-M-32	CH11-54	1	<i>fim fimAvMT78 papEF</i>	3	3 A - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP
O130:H30	1	0,8%	1 CTX-M-14b	CH27-400	1	<i>fimH</i>	1	1 A - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL SXT
O131:H27	1	0,8%	1 SHV-12	CH31-54	1	<i>fimH fimAvMT78 iutA iucD</i>	4	4 D - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP SXT
O132:HNM	1	0,8%	1 CTX-M-9	CH65-276	1	<i>fimH malX</i>	2	2 B1 - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP
O135:H21	1	0,8%	1 CTX-M-1	CH11-27	1	<i>fimH</i>	1	1 A - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL
O140:H27	1	0,8%	1 SHV-12	CH31-54	1	<i>fimH fimAvMT78 iutA iucD</i>	4	4 D - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN NAL CIP SXT
O145:H4	1	0,8%	1 CTX-M-32	CH11-30	1	<i>fimH</i>	1	1 A - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN NAL CIP
O145:H40	1	0,8%	1 SHV-12	CH11-24	1	<i>fimH</i>	1	1 A - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL
O145:HNM	1	0,8%	1 SHV-12	CH11-24	1	<i>fimH iutA iucD cvaC traT tsh</i>	6	6 A - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP
O146:H4	1	0,8%	1 CTX-M-1	CH45-97	1	<i>fimH papEF malX</i>	3	3 D - 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP FOF
					1	<i>fimH fimAvMT78 iron iss traT</i>	5	5 A - 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN TOB
					2		2	2 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN
O153:H10	7	5,5%	7 CTX-M-32	CH11-54	6	<i>fimH fimAvMT78</i>	2	2 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN
					1		1	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN TOB FOF
					1		1	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN TOB

Tabla 82. Continuación

Serotipo	Nº cepas	Tipado de BLEE	Clonotipo	Perfil de virulencia	Nº de genes	GF	EXPC	Perfil de Resistencia		
O153:H34	1	0,8%	1 CTX-M-14 CH88-27	1 <i>fimH papEF iutA iucD kpsMII-K5 traI malX usp</i>	8	D	+	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP		
O153:HNM	2	1,6%	1 CTX-M-9 CH4-58	1 <i>fimH papEF iutA iucD iron kpsMII-K1 iss traI malX</i>	9	D	+	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP SXT		
			1 CTX-M-NS NR	1 <i>fimH iutA iucD iron cva C iss</i>	6	B1	-	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN TOB NAL CIP SXT		
O157:HNM	1	0,8%	1 CTX-M-14 CH39-2	1 <i>fimH iron cva C</i>	3	B1	-	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP		
O159:H4	1	0,8%	1 CTX-M-1 CH45-97	1 <i>fimH fimAVMT78 papEF iutA iucD iron iss malX</i>	8	D	+	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL		
O173:H16	1	0,8%	1 CTX-M-32 CH4-38	1 <i>fimH</i>	1	B1	-	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN TOB NAL		
O173:HNT	1	0,8%	1 CTX-M-32 CH4-38	1 <i>fimH</i>	1	B1	-	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN NAL CIP		
O177:H32	2	1,6%	1 SHV-12 CH11-54	2 <i>fimH fimAVMT78 iutA iucD</i>	4	A	-	2 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP SXT		
			1 SHV-NS NR							
ONT:H1	1	0,8%	1 CTX-M-32 CH4-32	1 <i>fimH tsh</i>	2	A	-	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN		
ONT:H4	1	0,8%	1 CTX-M-1 CH45-97	1 <i>fimH papEF iutA iucD iron iss malX</i>	7	D	+	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMC AMP NAL		
ONT:H12	1	0,8%	1 CTX-M-1 CH11-23	1 <i>fimH traI</i>	2	A	-	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP		
ONT:H25	1	0,8%	1 SHV-12 CH31-27	1 <i>fimH iutA iucD iron iss traI tsh</i>	7	D	-	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP SXT		
ONT:H26	2	1,6%	2 CTX-M-14 CH11-24	2 <i>fimH iutA iucD</i>	3	A	-	2 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL		
ONT:H27	1	0,8%	1 SHV-12 CH31-54	1 <i>fimH fimAVMT78 iutA iucD</i>	4	D	-	1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP SXT		
ONT:H28	1	0,8%	1 CTX-M-1 CH29-38	1 <i>fimH iutA iucD iron cva C iss traI tsh</i>	8	B1	-	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP		
ONT:H40	1	0,8%	1 CTX-M-1 CH11-137	1 <i>fimH</i>	1	A	-	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP		
ONT:H49	1	0,8%	1 CTX-M-9 CH29-38	1 <i>fimH iutA iucD iron iss tsh</i>	6	B1	-	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL CIP SXT		
ONT:HNM	6	4,7%	1 CTX-M-1 CH7-25	1 <i>fimH</i>	1	A	-	2 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN TOB NAL CIP		
			1 CTX-M-32 CH276-108	1 <i>fimH papEF</i>	2	D	-			
			1 CTX-M-14 CH4-35	1 <i>fimH iutA iucD</i>	3	A	-	1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL		
			3 SHV-12 CH11-54	3 <i>fimH fimAVMT78 traI</i>	3	A	-	3 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL SXT		
					127	100,0%	127	4,7	2,1	127

4.3.2. Caracterización de las cepas BLEE aisladas de CARNE DE VACUNO

En la Tabla 79 (página 198) figuran las características de las 6 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de 5 de las 200 muestras analizadas de carne picada de vacuno.

4.3.2.1. Tipado de BLEE

De las 6 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, 4 cepas (66,7%) eran portadoras del gen *bla*_{CTX-M} exclusivamente, 1 cepa (16,7%) del gen *bla*_{SHV} y 1 cepa (16,7%) era portadora de ambos genes. Mediante secuenciación, se determinaron los siguientes tipos: CTX-M-1 (3 cepas); CTX-M-14 (1 cepa); SHV-12 (1 cepa); CTX-M-1/SHV-12 (1 cepa).

4.3.2.2. Serotipos y genes de virulencia

El serotipado de las 6 cepas de *E. coli* productoras de BLEE (CTX-M y SHV) aisladas de carne de vacuno, mostró que pertenecían a 6 serotipos distintos (Tabla 79, página 198).

Las 6 cepas fueron, además, caracterizadas mediante PCR para la presencia de 21 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC. Adicionalmente, las cepas fueron analizadas para aquellos genes de virulencia diarregénicos (incluido el gen *eae*) a los que hubiera sido positiva (en su caso) la muestra de alimento. De los 21 genes de ExPEC analizados, 2 fueron detectados en la mayoría de las cepas: *fimH* (100%) y *traT* (83,3%). En contraste, en ninguna de las 6 cepas fueron identificados los genes *papEF*, *afa/draBC*, *cdtB*, *sat*, *hlyA*, *kpsM* III y *usp*. Por otra parte, las 6 cepas productoras de BLEE presentaron una media de 5,3 genes de virulencia, con un rango que varió entre 3 y 9 genes. En particular, la cepa O7:H4 CTX-M-14 fue la que presentó un mayor número de genes de virulencia (9 genes).

Tres (50%) de las 6 cepas productoras de BLEE aisladas de carne de vacuno cumplían el criterio de estatus ExPEC (1 CTX-M-1, 1 CTX-M-14 y 1 CTX-M-1/SHV-12), ya que presentaron 2 o más de los 5 genes de virulencia (*papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iutA* y *kpsM* II) de acuerdo con la definición de Johnson y colaboradores (2003a).

Por último, 1 de las 6 cepas (16,7%) era positiva para el gen *eae*: la cepa O153:H10 SHV-12 *eae*- β 1.

4.3.2.3. Grupos filogenéticos

Las 6 cepas productoras de BLEE aisladas de carne de vacuno pertenecieron a 3 grupos filogenéticos: A (4 cepas; 66,6%), B1 (1 cepa; 16,7%) y D (1 cepa; 16,7%); y de ellas, las 3 cepas que presentaban estatus ExPEC pertenecían a los grupos filogenéticos A (1 cepa CTX-M-14 y 1 cepa CTX-M-1/SHV-12) y B1 (1 cepa CTX-M-1). En una misma muestra de carne de vacuno se identificaron 2 cepas pertenecientes a serotipos y filogrupos distintos (O8:HNM-A CTX-M-1 y O8:H19-B1 CTX-M-1) (Tabla 79, página 198).

4.3.2.4. Clonotipos

Siguiendo el esquema diseñado por Weissman y colaboradores (2012), se realizó el clonotipado (CH) mediante secuenciación de dos loci (*fumC/fimH*) de las 6 cepas BLEE aisladas de carne de vacuno, que mostró que pertenecían a 6 clonotipos distintos (Tabla 79, página 198).

De los 6 clonotipos, 5 habían sido identificados previamente en cepas aisladas de hemocultivos humanos, de entre una colección de 372 cepas del LREC (productoras y no productoras de BLEE); solo el clonotipo CH7-25 (detectado en este estudio en 1 cepa de carne de vacuno y 1 cepa de carne de pollo) no había sido previamente identificado (datos no publicados).

4.3.3. Caracterización de las cepas BLEE aisladas de CARNE DE CERDO

En la Tabla 80 (página 198) figuran las características de las 13 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas de 12 de las 200 muestras analizadas de carne picada de cerdo.

4.3.3.1. Tipado de BLEE

De las 13 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, 10 cepas (76,9%) eran portadoras del gen *bla*_{CTX-M} y 3 cepas (23%) del gen *bla*_{SHV}. Mediante secuenciación, se determinaron los siguientes tipos: CTX-M-1 (4 cepas); CTX-M-9 (1 cepa); CTX-M-14 (3 cepas); CTX-M-32 (2 cepas); SHV-12 (3 cepas).

4.3.3.2. Serotipos y genes de virulencia

El serotipado de las 13 cepas de *E. coli* productoras de BLEE (CTX-M y SHV) aisladas de carne de cerdo, mostró que pertenecían a 12 serotipos distintos (Tabla 80, página 198). Las 2 cepas que presentaron el mismo serotipo eran O25:H4 CTX-M-1.

Las 13 cepas fueron además caracterizadas mediante PCR para la presencia de 21 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC. Adicionalmente, las cepas fueron analizadas para aquellos genes de virulencia diarreagénicos (incluido el gen *eae*) a los que hubiera sido positiva (en su caso) la muestra de alimento. De los 21 genes ExPEC analizados, los genes más prevalentes fueron *fimH* (100%), *traT* (76,9%), *iss* (61,5%) e *iroN* (53,8%). En contraste, en ninguna de las cepas fueron identificados los genes *papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *cnf1*, *sat*, *hlyA*, y *kpsM* III. Por otra parte, las 13 cepas productoras de BLEE presentaron una media de 5,8 genes de virulencia, con un rango que varió entre 1 y 12 genes. En concreto, 1 de las cepas O25:H4 CTX-M-1 presentaba 12 genes de virulencia.

Dos (15,4%) de las 13 cepas productoras de BLEE aisladas de carne de cerdo cumplían el criterio de estatus ExPEC (1 CTX-M-1 y 1 CTX-M-14), ya que presentaron 2 o más de los 5 genes de virulencia (*papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iutA* y *kpsM* II) de acuerdo con la definición de Johnson y colaboradores (2003a).

Por último, 1 de las 13 cepas (7,7%) era positiva para el gen *eae*: la cepa O153:H10 CTX-M-32 *eae*-β1.

4.3.3.3. Grupos filogenéticos

Las 13 cepas productoras de BLEE aisladas de carne de cerdo pertenecieron a los 4 grupos filogenéticos: A (4 cepas; 30,8%), B1 (3 cepas; 23,0%), B2 (2 cepas; 15,4%) y D (4 cepas; 30,8%); y de ellas, las 2 cepas que presentaban estatus ExPEC pertenecían a los grupos filogenéticos B2 (1 cepa CTX-M-1) y D (1 cepa CTX-M-14). En una misma muestra de carne de cerdo se identificaron 2 cepas pertenecientes a serotipos y filogrupos distintos (O25:H4-B2 CTX-M-1 y ONT:H4-D CTX-M-1) (Tabla 80, página 198).

4.3.3.4. Clonotipos

El clonotipado de las 13 cepas BLEE aisladas de carne de cerdo reveló 9 clonotipos distintos. El más prevalente fue el CH45-97 detectado en 3 cepas del filogrupa D pertenecientes a 3 serotipos distintos, pero todas ellas portadoras del antígeno H4 (O8:H4, O161:H4 y ONT:H4) (Tabla 80, página 198).

De los 9 clonotipos, 7 habían sido identificados previamente en cepas aisladas de hemocultivos humanos, de entre una colección de 372 cepas del LREC (productoras y no productoras de BLEE), mientras que los clonotipos CH6-53 y CH7-470 (detectados en este estudio, en 1 cepa de carne de cerdo, cada uno) no habían sido previamente identificados (datos no publicados).

4.3.4. Caracterización de las cepas BLEE aisladas de CARNE DE AVE

En la Tabla 82 (página 199) figuran las características de las 127 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas de 91 de las 200 muestras analizadas de carne de ave.

4.3.4.1. Tipado de BLEE

De las 127 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, 98 cepas (77,2%) eran portadoras del gen *bla*_{CTX-M} y 29 cepas (22,8%) del gen *bla*_{SHV}. Hay que tener en cuenta en estos porcentajes, que las 98 cepas CTX-M procedían de 76 de 200 (38%) muestras de carne de ave analizadas para este gen, mientras que para el gen *bla*_{SHV} solo se analizaron 100 de las 200 muestras totales de carne de ave, por lo que las 29 cepas SHV procedían de 28 de las 100 (28%) analizadas.

Mediante secuenciación, se determinaron los siguientes tipos: CTX-M-1 (27 cepas); CTX-M-9 (18 cepas); CTX-M-14 (28 cepas); CTX-M-14b (4 cepas); CTX-M-32 (15 cepas); SHV-12 (28 cepas); además, 7 cepas no pudieron ser tipificadas (6 del tipo CTX-M y 1 del tipo SHV).

4.3.4.2. Serotipos y genes de virulencia

El serotipado de las 127 cepas de *E. coli* productoras de BLEE (CTX-M y SHV) aisladas de pechugas de pollo, mostró que pertenecían a 91 serotipos distintos (Tabla 82, página

199). Los serotipos detectados en más de 2 cepas fueron: O25:H4 (7 cepas CTX-M-9; 5,5%), O153:H10 (7 cepas CTX-M-32; 5,5%), O3:H26 (3 cepas CTX-M-14; 2,4%), O6:HNT (3 cepas CTX-M-14; 2,4%), O6:H16 (2 cepas CTX-M-14 y 1 cepa CTX-M-14b; 2,4%), ONT:HNM (6 cepas con distintos tipos BLEE; 4,7%). El resto de serotipos se detectó en 1 o 2 cepas.

Las 127 cepas fueron además caracterizadas mediante PCR para la presencia de 21 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC. Adicionalmente, las cepas fueron analizadas para aquellos genes de virulencia diarregénicos (incluido el gen *eae*) a los que hubiera sido positiva (en su caso) la muestra de alimento. De los 21 genes ExPEC analizados, los genes más prevalentes fueron *fimH* (97,6%), *iutA* (55,1%), *iucD* (55,1%), *iss* (44,9%) e *iroN* (44,1%). En contraste, en ninguna de las cepas fueron identificados los genes *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *cnf1* y *hlyA*. Por otra parte, las 127 cepas productoras de BLEE presentaron una media de 4,7 genes de virulencia, con un rango que varió entre 1 y 13 genes. En concreto, las cepas con mayor número de genes de virulencia pertenecieron a los serotipos O2:HNM (1 cepa CTX-M-14 con 13 genes de virulencia), O120:H4 (1 cepa CTX-M-1 con 12 genes de virulencia) y O25:H4 (las 7 cepas CTX-M-9, con 12 genes de virulencia).

Veintiuna (16,5%) de las 127 cepas productoras de BLEE aisladas de pechuga de pollo cumplían el criterio de estatus ExPEC (6 CTX-M-1, 9 CTX-M-9, 3 CTX-M-14, 1 CTX-M-14b y 2 SHV-12), ya que presentaron 2 o más de los 5 genes de virulencia (*papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iutA* y *kpsM II*) de acuerdo con la definición de Johnson y colaboradores (2003a).

Por último, 24 de las 127 cepas (18,9%) eran positivas para el gen *eae*: 20 cepas portadoras del subtipo *eae*- β 1 (2 cepas O2:H40 CTX-M, 2 cepas O3:H26 CTX-M-14, 1 cepa O26:HNM CTX-M-32, 1 cepa O40:H10 CTX-M-14, 1 cepa O103:HNM SHV-12, 1 cepa O123:H34 SHV-12, 1 cepa O124:HNM CTX-M-32, las 7 cepas O153:H10 CTX-M-32, 1 cepa ONT:HNM CTX-M-32, 3 cepas ONT:HNM SHV-12) y 4 cepas portadoras del subtipo *eae*- ϵ 1 (2 cepas O145:H40/HNM SHV-12 y 2 cepas ONT:H26 CTX-M-14).

4.3.4.3. Grupos filogenéticos

Las 127 cepas productoras de BLEE aisladas de pechuga de pollo pertenecieron a los 4 grupos filogenéticos: A (56 cepas; 44,1%), B1 (36 cepas; 28,3%), B2 (9 cepas; 7,1%) y D (26 cepas; 20,5%); y de ellas, las 21 cepas que presentaban estatus ExPEC pertenecían a los grupos filogenéticos B2 (9 cepas; incluidas las 7 O25:H4 CTX-M-9, 1 cepa CTX-M-1 y 1 cepa CTX-M-14), D (7 cepas; incluidas 3 CTX-M-1, 2 CTX-M-9 y 2 cepas CTX-M-14) y A (5 cepas; incluidas 2 SHV-12, 2 CTX-M-1 y 1 CTX-M-14b). En 21 muestras de pechuga de pollo se aislaron 2 cepas pertenecientes a filogrupos y/o serotipos distintos (y en 2 de esas 21 muestras hasta 3 cepas BLEE distintas) (Tabla 82, página 199).

4.3.4.4. Clonotipos

Se realizó el clonotipado de 118 de las 127 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas de carne de ave. Entre las 118 analizadas, se detectaron un total de 45 clonotipos diferentes. De esos 45 clonotipos, 6 fueron los más prevalentes, detectados en 50 de las 118 cepas (42,4%): CH11-54 (17 cepas del filogrupo A, incluidas 7 O153:H10); CH40-22 (8 cepas del filogrupo B2, incluidas 7 cepas O25:H4); CH45-97 (7 cepas del filogrupo D, pertenecientes a 7 serogrupos distintos pero todas H4); CH11-24 (6 cepas del filogrupo A); CH11-34 (6 cepas del filogrupo A, incluidas 3 O6:H16 Y 3 O6:HNT); CH31-54 (6 cepas del filogrupo D, pertenecientes a 6 serogrupos distintos pero H27 o HNT).

De los 45 clonotipos, 26 habían sido identificados previamente en cepas aisladas de hemocultivos humanos, de entre una colección de 372 cepas del LREC (productoras y no productoras de BLEE) (datos no publicados). Sin embargo, 19 de los 45 clonotipos no habían sido previamente identificados en dicha colección, y todos, salvo el CH7-25 (detectado también en 1 cepa de carne de vacuno), podrían estar asociados al origen aviar de las cepas. Esos 19 clonotipos se identificaron en 32 cepas de carne de pollo. Hay que destacar que el clonotipo CH632-54 ha sido identificado por primera vez en este estudio; incluye un nuevo alelo del *fumC* (632) que varía únicamente en 1 nucleótido con respecto al *fumC*27 (el clonotipo CH27-54 sí había sido identificado en cepas de hemocultivos).

Hemos comprobado que, aunque en la mayoría de los casos un clonotipo determinado

está asociado a cepas del mismo grupo filogenético, mismos clonotipos pueden identificarse en cepas de distintos serotipos e, incluso, de diferente grupo filogenético. En nuestro estudio hemos detectado 4 clonotipos en cepas de distinto grupo filogenético (CH4-27 identificado en 1 cepa O8:HNM-B1 y 1 cepa O8:H19-A; CH4-32 identificado en 3 cepas B1 y 1 cepa A; CH39-2 identificado en 1 cepa O157:HNM-B1 y 1 cepa O2:HNM-B2) (Tabla 82, página 199). Este hecho lo hemos constatado, asimismo, con cepas de otros orígenes (datos no publicados).

4.3.5. Caracterización de las cepas BLEE aisladas de PRODUCTOS AGRÍCOLAS

En la Tabla 81 (página 198) figuran las características de las 2 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas de 2 de las 350 muestras analizadas de productos agrícolas. En concreto, las cepas fueron aisladas de 1 ensalada envasada y de 1 muestra de brécol. En el caso de productos agrícolas, no se investigó la presencia de cepas SHV.

4.3.5.1. Tipado de BLEE

Mediante secuenciación se determinó que las 2 cepas de *E. coli* aisladas de productos agrícolas y portadoras del gen *bla*_{CTX-M} eran CTX-M-1.

4.3.5.2. Serotipos y genes de virulencia

Las 2 cepas *E. coli* CTX-M-1 aisladas de 1 ensalada envasada y 1 muestra de brécol, respectivamente, presentaban serotipos distintos: O8:H7 y ONT:HNM (Tabla 81, página 198).

Solo 1 de las 2 cepas fue positiva para alguno de los 21 genes de virulencia típicos de cepas ExPEC analizados mediante PCR, en concreto la cepa O8:H7 CTX-M-1 fue positiva para 3 genes: *fimH*, *iroN*, *iss*. La cepa ONT:HNM CTX-M-1 fue negativa para todos los genes de virulencia analizados. Ninguna de las 2 cepas cumplía el criterio de estatus ExPEC, y ninguna era portadora del gene *eae*.

4.3.5.3. Grupos filogenéticos

Las 2 cepas CTX-M-1 aisladas de productos agrícolas pertenecieron a 2 grupos filogenéticos distintos: A y B1.

4.3.5.4. Clonotipos

Se realizó el clonotipado de 1 de las 2 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, en concreto de la cepa O8:H7-B1 CTX-M-1, que presentó el clonotipo CH19-87, no identificado previamente en cepas aisladas de hemocultivos humanos, de entre una colección de 372 cepas (productoras y no productoras de BLEE) (datos no publicados).

4.3.6. Patrones de resistencia de las cepas BLEE

Se realizó el estudio de sensibilidad de las 148 cepas de *E. coli* identificadas como BLEE, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 17 antibióticos, mediante el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 Plus en la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA).

Globalmente, detectamos 36 patrones de resistencia. Con la salvedad de 1 cepa aislada de carne de pollo con resistencia frente a únicamente 2 antimicrobianos (esta cepa había perdido el gen *bla*_{CTX} durante su conservación y, probablemente, otras resistencias asociadas a un mismo plásmido), el resto de cepas presentaron patrones de multirresistencia de entre 6 y 11 de los 17 antimicrobianos ensayados. De hecho, la mayoría de las cepas (130 de las 148; 87,8%) presentaron resistencia frente a al menos 7 antimicrobianos (83,3% de las cepas de carne de vacuno; 84,6% de las cepas de carne de cerdo; 89,8% de las cepas de carne de pollo). De entre los 36 patrones encontrados, el más prevalente fue el P23, resistente frente a 8 antimicrobianos (CEF, CFZ, CXM, CTX, FEP, AMP, NAL y CIP), detectado en 22 cepas (1 aislada de carne de vacuno, 2 de carne de cerdo y 19 de carne de pollo) (Tabla 83).

Tabla 83. Patrones de resistencia de las cepas de *E. coli* BLEE aisladas de los 4 grupos de alimentos

Patrón	Nº de cepas (%)	V-P-A-PA	Tipo de BLEE		CEF	CFZ	CXM	CTX	CAZ	FEP	FOX	AMC	TZP	AMP	GEN	TOB	NAL	CIP	SXT	FOF	*Nº		
1	3	2,0%	1-0-0-0	CTX-M-1	1																	11	
			0-0-1-0	CTX-M-14	1	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	R	R	R	R	R	-		-
			0-0-1-0	CTX-M-NS	1																		
2	1	0,7%	0-0-1-0	CTX-M-1	1	R	R	R	R	-	R	R	R	-	R	-	-	R	R	R	-	11	
3	1	0,7%	0-0-1-0	SHV-12	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	R	R	-	R	-	11	
4	1	0,7%	0-0-1-0	SHV-12	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	R	R	R	-	11	
5	3	2,0%	0-0-1-0	CTX-M-1	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	R	R	R	-	-	11	
			0-0-2-0	CTX-M-32	2																		
6	1	0,7%	0-0-1-0	CXT-M-9	1	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	R	R	R	R	-	10	
7	1	0,7%	0-0-1-0	SHV-12	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	R	-	R	-	10	
8	2	1,4%	0-0-2-0	CTX-M-1	2	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	R	R	R	R	-	-	10	
9	1	0,7%	0-0-1-0	SHV-12	1	R	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	-	-	-	-	10	
10	3	2,0%	0-0-3-0	CTX-M-32	3	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	R	R	-	-	10	
11	5	3,4%	0-0-4-0	SHV-12	4	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	R	R	R	-	10	
			0-0-1-0	SHV-NS	1																		
12	1	0,7%	0-0-1-0	CTX-M-32	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	R	-	-	-	R	10	
13	1	0,7%	0-0-1-0	CTX-M-32	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	R	R	-	-	-	10	
14	10	6,8%	0-1-3-0	CTX-M-9	4																	9	
			0-0-3-0	CTX-M-14	3	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	R	R	R	-		
			0-0-2-0	CTX-M-14b	2																		
			0-0-1-0	CTX-M-1	1																		
15	1	0,7%	0-0-1-0	CTX-M-14	1	R	R	R	R	-	R	R	-	-	R	-	-	R	R	-	9		
16	8	5,4%	0-0-1-0	CTX-M-NS	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	R	R	-	-	9	
			0-2-5-0	SHV-12	7																		
17	1	0,7%	1-0-0-0	CTX-M-1	1	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	R	R	R	-	-	9		
18	1	0,7%	0-0-1-0	CTX-M-14	1	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	R	-	R	R	-	-	9	
19	2	1,4%	0-0-2-0	CTX-M-9	2	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	R	-	R	-	R	-	9	
20	5	3,4%	0-1-0-0	CTX-M-32	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	R	-	R	-	9	
			0-0-4-0	SHV-12	4																		
21	1	0,7%	0-0-1-0	SHV-12	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	R	-	-	-	9	
22	2	1,4%	0-0-2-0	CTX-M-32	2	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	R	R	-	-	-	9	
23	22	14,9%	1-2-13-0	CTX-M-14	16																	8	
			0-0-4-0	CTX-M-1	4	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	R	R	-	-		
			0-0-1-0	CTX-M-9	1																		
			0-0-1-0	CTX-M-NS	1																		
24	6	4,1%	0-0-1-0	CTX-M-1	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	R	-	-	-	8	
			0-0-5-0	SHV-12	5																		
25	2	1,4%	0-0-2-0	CTX-M-1	2	R	R	R	R	-	R	-	R	-	-	R	-	-	R	-	-	8	
26	10	6,8%	0-1-2-0	CTX-M-1	3																	8	
			0-0-5-0	CTX-M-9	5	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	R	-	R	-		
			0-0-2-0	CTX-M-14b	2																		
27	4	2,7%	0-1-3-0	CTX-M-32	4	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	-	-	8		
28	12	8,1%	0-0-1-0	CTX-M-NS	1																	7	
			0-0-7-0	CTX-M-14	7	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	R	-	-	-		
			0-1-3-0	CTX-M-1	4																		
29	1	0,7%	0-0-1-0	SHV-12	1	R	R	R	R	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	7		
30	5	3,4%	1-0-0-0	CTX-M-1	1																	7	
			0-0-1-0	CTX-M-NS	1	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-		
			0-0-3-0	CTX-M-9	3																		
31	2	1,4%	0-0-2-0	CTX-M-1	2	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	-	-	R	7		
32	7	4,7%	0-1-0-0	CTX-M-1	1																	7	
			0-0-1-0	CTX-M-32	1	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-		
			1-0-4-0	SHV-12	5																		
33	1	0,7%	0-1-0-0	SHV-12	1	R	R	R	-	R	R	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	7	
34	3	2,0%	0-0-1-0	CTX-M-9	1	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	7	
			0-0-2-0	CTX-M-32	2																		
35	17	11,5%	0-1-8-2	CTX-M-1	11																	6	
			0-0-2-0	CTX-M-9	2	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-		
			0-1-2-0	CTX-M-14	3																		
			1-0-0-0	CTX-M-1+SHV-12	1																		
36	1	0,7%	0-0-1-0	CTX-M-NS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	R	-	-	-	2		
TOTAL	148		6-13-127-2		148	147	147	147	146	51	146	3	4	1	148	31	16	104	61	46	3	(2-11)	
%			4%-9%-86%-1%			99%	99%	99%	99%	34%	99%	2%	3%	1%	100%	21%	11%	70%	41%	31%	2%		

CEF: cefalotina, CFZ: cefazolina, CXM: cefuroxima, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, FOX: Cefoxitina, AMC: Amoxicilina/clavulánico, TZP: Piperacilina/tazobactam, AMP: Ampicilina, GEN: Getamicina, TOB: Tobramicina, NAL: Ácido Nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol, FOF: Fosfomicina.

V-P-A-PA= número de cepas de vacuno, porcino, ave y productos agrícolas

NS: no secuenciada

* Nº. Número de antibióticos frente a los que eran resistentes las cepas. Ninguna cepa presentó resistencia frente al imipenem (IMP)

Analizando las prevalencias de resistencia por antimicrobiano, todas las cepas, salvo la que había perdido el gen *bla*_{CTX}, fueron resistentes a cefalosporinas de espectro extendido; además, las 148 cepas (100%) presentaron resistencia a la ampicilina y 104 (70,3%) al ácido nalidíxico. Es importante destacar que el 41,2% de las cepas era resistente a la ciprofloxacina, el 31,1% al trimetoprim-sulfametoxazol, el 20,9% a la gentamicina y el 10,8% a la tobramicina. Por último, muy pocas cepas presentaron resistencia frente a los inhibidores de las β -lactamasas (4 cepas de carne de pollo frente a la amoxicilina-ácido clavulánico y 1 cepa, también de carne de pollo, frente a la piperacilina-tazobactam), frente a las cefamicinas (3 cepas de carne de pollo frente a la cefoxitina) o a la fosfomicina (3 cepas de carne de pollo). En cualquier caso, no encontramos diferencias significativas en las prevalencias de resistencia frente a los 17 antimicrobianos analizados entre las cepas aisladas de los 3 tipos de carne ($p > 0,05$ para todas las comparaciones) (Tabla 84).

Tabla 84. Prevalencias de resistencia a antimicrobianos en las cepas de *E. coli* productoras de BLEE

Resistencia antimicrobiana	Vacuno		Cerdo		Ave		P. agrícolas	
•Penicilinas (AMP)	6	100%	13	100%	127	100%	2	100%
•Quinolonas (NAL)	3	50%	8	61,5%	93	73,2%	0	0%
•Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	2	33%	4	30,8%	40	31,5%	0	0%
•Fluoroquinolonas (CIP)	2	33%	5	38,5%	54	42,5%	0	0%
•Aminoglucósidos (GEN-TOB)	2	33%	1	7,7%	29	22,8%	0	0%
•Cefalosporinas (1ª - 4ª generación) (CEF-CFZ-CXM-CTX-CAZ-FEP)	6	100%	13	100%	126	99,2%	2	100%
◦Cefalosporinas de espectro extendido (CTX-CAZ-FEP)	6	100%	13	100%	126	99,2%	2	100%
•Inhibidores de β -lactamasas (AMC-TZP)	0	0%	0	0%	5	3,9%	0	0%
•Cefamicina (FOX)	0	0%	0	0%	3	2,4%	0	0%
•Fosfomicina (FOF)	0	0%	0	0%	3	2,4%	0	0%
Multirresistentes a 4 o más familias	3	50%	7	53,8%	80	63%	0	0%
Multirresistentes a 3 familias	1	17%	3	23,1%	29	22,8%	0	0%
Multirresistentes a 2 familias	2	33%	3	23,1%	18	14,2%	2	100%
Resistentes a 1 familia	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Total resistentes	6	100%	13	100%	127	100%	2	100%
No se apreciaron diferencias significativas en las prevalencias de resistencia entre las cepas de carne de vacuno, porcino y ave								

Específicamente, las 26 cepas productoras de BLEE y positivas para el gen *eae* presentaron 13 patrones de resistencia, compartidos en su mayoría con el resto de cepas BLEE *eae* negativas (incluido el patrón de resistencias más prevalente frente a 8 antimicrobianos, P23). Globalmente, 23 (84,6%) de las 26 cepas *eae* positivas presentaban multirresistencia a 3 o más familias de antibióticos. Todas, salvo la cepa que había perdido el gen *bla*_{CTX}, eran resistentes a cefalosporinas de espectro extendido, y el 100% resistentes a la ampicilina. Además, el 61,5% de las cepas era resistente frente al ácido nalidíxico, el 46,2% frente a la gentamicina, el 19,2% frente a la tobramicina, el

15,4% frente a la ciprofloxacina, y el 11,5% frente al trimetoprim-sulfametoxazol. Encontramos diferencias significativas entre este grupo *eae* positivo y el resto de cepas BLEE (122 cepas) en la resistencia frente a 3 antimicrobianos; con mayor prevalencia de resistencias a los aminoglucósidos (46,2% de cepas *eae* positivas vs. 16,4% de las *eae* negativas), y menor a las fluoroquinolonas (15,4% de las cepas *eae* positivas vs. 46,7% de las *eae* negativas) y al trimetoprim-sulfametoxazol (11,5% de las cepas *eae* positivas vs. 35,2% de las *eae* negativas); por último, 81 (66,4%) de las 122 cepas *eae* negativas eran multirresistentes a 4 o más familias de antibióticos, frente al 34,6% de las cepas *eae* positivas ($p < 0,05$ para todas las comparaciones) (Tabla 85).

Tabla 85. Comparación de prevalencias de resistencia entre cepas de *E. coli* productoras de BLEE *eae* positivas y negativas

Resistencia antimicrobiana	<i>eae</i> ⁺ (n=26)		<i>eae</i> ⁻ (n=122)		<i>p</i> [*]
•Penicilinas (AMP)	26	100%	122	100%	
•Quinolonas (NAL)	16	61,5%	88	72,1%	
•Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	3	11,5%	43	35,2%	0,012
•Fluoroquinolonas (CIP)	4	15,4%	57	46,7%	0,002
•Aminoglucósidos (GEN-TOB)	12	46,2%	20	16,4%	0,002
•Cefalosporinas (1 ^a - 4 ^a generación) (CEF-CFZ-CXM-CTX-CAZ-FEP)	25	96,2%	122	100%	
◦Cefalosporinas de espectro extendido (CTX-CAZ-FEP)	25	96,2%	122	100%	
•Cefamicina (FOX)	0	0%	3	2,5%	
•Fosfomicina (FOF)	1	3,8%	2	1,6%	
Multirresistentes a 4 o más familias	9	34,6%	81	66,4%	0,003
Multirresistentes a 3 familias	14	53,8%	19	15,6%	0,000
Multirresistentes a 2 familias	3	11,5%	22	18,0%	
Resistentes a 1 familia	0	0%	0	0%	
Total resistentes	26	100%	122	100%	

* Únicamente se muestran los valores que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$)

4.3.7. Análisis comparativo de las cepas BLEE aisladas de alimentos

Como se comentó en el apartado 4.3.1 (página 196), el 11,6% de las muestras (110 de 950) de alimentos analizados en este estudio resultaron positivas para el aislamiento de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, siendo el 9,6% positivas para CTX-M (91 de las 950) y el 6,6% positivas para SHV (33 de las 500 analizadas para este tipo). Encontramos un número significativamente superior de muestras de carne de ave portadoras de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, en comparación con los otros grupos de alimentos analizados (2,5% carne de vacuno; 6% en carne de cerdo; 45,5% en carne de ave y 0,6% en productos agrícolas; $p < 0,05$ para todas las comparaciones) (Tabla 78, página 197). Los altos niveles de contaminación en carne de pollo detectados en este estudio concuerdan con lo recogido en las revisiones más recientes de la literatura científica, tanto en

relación con la presencia de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales en el hombre, como con la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE potencialmente patógenas (Manges y Johnson, 2012; Lazarus *et al.*, 2015).

La presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en alimentos se ha convertido en una preocupación a nivel mundial. Los porcentajes de aislamiento de este tipo de cepas, tanto en los animales de producción como en los alimentos, varían mucho de unos estudios a otros (entre 0,2% a valores superiores al 50%), dependiendo del país de origen del producto y la metodología utilizada (EFSA, 2011c). Tanto es así, que algunos estudios señalan a las carnes importadas de países sudamericanos como fuente importante de este tipo de cepas por sus elevados niveles de contaminación (Dhanji *et al.* 2010; Borjesson *et al.* 2011; Kawamura *et al.* 2014). Kawamura y colaboradores (2014) en un estudio comparable al nuestro, pero con menor tamaño de muestreo, analizaron 153 muestras de carne de pollo, vacuno, cerdo y productos agrícolas, adquiridas en 29 supermercados de Japón durante 2010. Solo encontraron cepas *E. coli* BLEE en la carne de pollo, con una prevalencia ligeramente superior a la nuestra (50,7%; 35 de 69 muestras). Además, los autores detectaron diferencias según el origen, de manera que la prevalencia era superior en las carnes importadas de países sudamericanos que en las carnes autóctonas. En el Reino Unido, se detectaron cepas de *E. coli* productoras de BLEE en 62 (29,5%) de 210 lotes de carne de pollo importada de Sudamérica (Dhanji *et al.* 2010). Y en un estudio realizado en Túnez, los niveles de aislamiento fueron de entre 12,6-26% entre diferentes alimentos, incluidos carnes de aves (Jouini *et al.* 2007). En nuestro estudio, hemos encontrado un elevado porcentaje de muestras de carne de pollo con aislamiento de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (45,5%), comparable a las altas prevalencias anteriormente reseñadas, pero muy inferior a la reportada por otros autores (Egea *et al.* 2012; Ghodousi *et al.* 2015; Overdeest *et al.* 2011; Leverstein-van Hall *et al.* 2011). Egea y colaboradores (2011, 2012) en sendos estudios realizados en España, detectaron un incremento en la prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en carne de ave (pollo y pavo) procedente de establecimientos sevillanos del 62,5% en su estudio del 2007, al 93,3% en su estudio del 2010. En los Países Bajos, dos estudios independientes reportaron prevalencias *E. coli* productoras de BLEE en carne de pollo, adquiridas en establecimientos locales del 79,8%

(Overdevest *et al.* 2011) y del 94% (Leverstein-van Hall *et al.* 2011). Y en Italia, Ghodousi y colaboradores (2015) aislaron cepas de *E. coli* productoras de BLEE en 132 (98,5%) de 163 muestras de carne de pollo.

En cuanto a la detección de cepas productoras de BLEE en productos agrícolas, no existen demasiados estudios al respecto. Muchos productos agrícolas se consumen crudos, por lo que existe elevada posibilidad de transferencia de este tipo de cepas bacterianas al hombre. Algunos autores han llamado la atención sobre la presencia de cepas productoras de BLEE en aguas residuales tratadas, y el riesgo potencial de transmisión de estas bacterias en su uso en la agricultura (Pignato *et al.* 2009). También se ha identificado como ruta de transmisión la aplicación de abono orgánico (Boehme *et al.* 2004). En nuestro estudio aislamos *E. coli* productoras de BLEE en un 0,6% de las muestras de productos agrícolas. Además, 1 de las 2 muestras positivas se trataba de una ensalada lista para consumo. También en España, y en una ensalada lista para consumo de 32 analizadas (3,1%), Egea y colaboradores (2011) aislaron 1 cepa SHV-12. En los Países Bajos, Reuland y colaboradores (2014) encontraron una prevalencia del 6% (7/119) de cepas productoras de BLEE en productos vegetales de 15 tipos, adquiridos en diferentes establecimientos de venta; aunque las bacterias aisladas pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, no aislaron cepas de la especie *E. coli*. Said y colaboradores (2015), sin embargo, aislaron cepas de *E. coli* productoras de BLEE en 2 (tomate y perejil) (4,4%) de los 45 productos vegetales muestreados en 13 mercados de Túnez. También en el caso de productos agrícolas se encuentran datos de mayores niveles de contaminación vinculados a determinados orígenes geográficos; así, Zurfluh y colaboradores (2015) examinaron en Suiza los productos agrícolas frescos importados de la República Dominicana, India, Thailandia y Vietnam, encontrando que el 25,4% de 169 muestras eran portadoras de cepas bacterianas productoras de BLEE, y específicamente 20 muestras (11,8%) eran portadoras de cepas de *E. coli* BLEE positivas.

Tipificamos mediante secuenciación el gen *bla* de 141 de las 148 cepas de *E. coli* BLEE, aisladas de las 110 muestras de alimentos (no se pudo secuenciar el gen *bla*_{CTX} en 6 cepas y el gen *bla*_{SHV} en 1 cepa). Globalmente, 54 cepas eran portadoras de *bla*_{CTX} del grupo 1 (37 cepas CTX-M-1 y 17 cepas CTX-M-32) y 55 cepas de *bla*_{CTX} del grupo 9 (19

cepas CTX-M-9 y 36 cepas CTX-M-14/14b) (Tabla 86). Por origen geográfico, los tipos de CTX-M detectados en las cepas aisladas de alimentos de este estudio fueron los esperables: el tipo CTX-M-1 se encuentra diseminado entre los animales de producción y alimentos de la mayoría de los países europeos; los tipos CTX-M-14 y CTX-M-32 aparecen asociados a animales de producción y alimentos de los países mediterráneos y del sur de Europa; el tipo CTX-M-9 aparece muy vinculado a los datos de España, en aves y porcino. Por otro lado, el tipo CTX-M-15 diseminado de una manera pandémica en la población humana, solo se ha detectado de forma accidental en los animales de producción o en los alimentos en muy pocos países europeos, al contrario de lo que ocurre en países asiáticos (Cortés *et al.* 2010; Mora *et al.* 2010; EFSA, 2011c; Blaak *et al.* 2015). Específicamente en carne de pollo, hemos identificado los mismos tipos de BLEE, con unas prevalencias similares, que los reportados por Egea y colaboradores (2012), también en carne de ave muestreada en establecimientos sevillanos.

En España, los tipos de BLEE predominantes producidos por cepas de *E. coli* implicadas en patología humana son CTX-M, principalmente CTX-M-14 y CTX-M-15, siendo el grupo clonal ST131 el responsable de la creciente emergencia de CTX-M-15 (Blanco M *et al.*, 2009). Concretamente en Galicia, todos los tipos BLEE identificados entre las cepas aisladas de alimentos del presente estudio (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-14b, CTX-M-32, SHV-12) fueron identificados en estudios previos, con la significativa diferencia de que entre las cepas de alimentos no se detectó el tipo CTX-M-15 (segundo en prevalencia entre cepas de origen humano, después del CTX-M-14) (Blanco M. *et al.* 2009; Mora *et al.* 2011a). Valentin y colaboradores (2014), en un macroestudio realizado en Alemania de 1.329 cepas de *E. coli* productoras de BLEE procedentes de diferentes fuentes del entorno agrario (gallinas, vacas, cerdos y animales de compañía), de patología veterinaria y de seres humanos (población general, casos ambulatorios y casos nosocomiales), identificaron globalmente los mismo tipos de BLEE entre las cepas de *E. coli* de origen animal y humano (incluidos los hallados en el presente estudio), pero encontraron diferencias significativas de prevalencia según fuesen de origen animal o humano, siendo las más comunes en su estudio CTX-M-1 (63,3% de las cepas de origen animal vs. 29,3% de origen humano), CTX-M-15 (17,7% origen animal vs. 48% origen humano) y CTX-M-14 (5,3% animal vs. 8,7% humano).

En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas del tipo de CTX-M en relación con el tipo de alimento. Y aunque no se encontraron diferencias significativas en las prevalencias de resistencia frente a los 17 antimicrobianos analizados entre las cepas aisladas de los 3 tipos de carne ($p>0,05$ para todas las comparaciones), tal y como se indica en el apartado anterior, sí detectamos diferencias significativas asociadas al grupo CTX-M. Así, las 54 cepas positivas para CTX-M del grupo 1 mostraron niveles de resistencia significativamente superiores frente a los aminoglucósidos y la ceftazidima ($p<0,05$), mientras que las 55 cepas positivas para CTX-M del grupo 9 mostraron niveles de resistencia significativamente superiores frente a el ácido nalidíxico, la ciprofloxacina y el trimetoprim-sulfametoxazol ($p<0,05$) (Tabla 86).

Tabla 86. Resistencias asociada de las 109 cepas de *E. coli* BLEE del tipo CTX-M

BLEE	Vacuno	Cerdo	Pollo	Agrícolas	TOTAL	CTX-M-grupo	CAZ	GEN TOB	NAL	CIP	SXT	<i>p</i>
CTX-M-1	4	4	27	2	37	Grupo 1	18	20	28	15	8	<0,05 para todas las comparaciones
CTX-M-32	0	2	15	0	17							
CTX-M-9	0	1	18	0	19	Grupo 9	0	6	46	30	23	
CTX-M-14/14b	1	3	32	0	36							
TOTAL	5	10	92	2	109*							

*De las 115 cepas positivas para el gen *bla*_{CTX-M}, 6 cepas no pudieron ser tipificadas por haber perdido dicho gen

En concordancia con los estudios europeos, en los que se encuentra una elevada diseminación de las BLEE del tipo SHV, fundamentalmente SHV-12 y SHV-2 (EFSA, 2011c), todas las cepas SHV del presente estudio, aisladas de carne de vacuno, cerdo y pollo, fueron SHV-12, con elevados niveles de resistencias asociadas que, comparados con los de las cepas CTX-M (del grupo 1 y 9 conjuntamente), presentaron una importante diferencia con respecto a la ceftazidima: el 93,9% de las cepas SHV eran resistentes frente al 16,5% de las cepas CTX-M ($p<0,05$).

Los elevados niveles de coresistencia detectados en las cepas BLEE de este estudio a determinados antimicrobianos, sugiere la coselección de cepas a través de la aplicación de los mismos en medicina veterinaria. Este hecho también ha sido sugerido por otros investigadores (Rao *et al.* 2014) en relación con la creciente presencia de determinados tipos CTX-M en animales de producción en China. Al igual que nosotros, estos autores encontraron que las cepas productoras de CTX-M del grupo 1, mostraban niveles de resistencia significativamente superiores frente a la ceftazidima y al aminoglucósido

amikacina, en comparación con las cepas CTX-M del grupo 9. Lo que es más preocupante es que estos autores encontraron, además, elevados niveles de resistencia a la fosfomicina, principalmente asociada a cepas CTX-M del grupo 1. En nuestro caso detectamos 3 cepas positivas (2,1%) para la fosfomicina de las 141 tipificadas, las 3 cepas fueron aisladas de carne de pollo y eran CTX-M del grupo 1.

Constatamos una alta heterogeneidad entre las 148 cepas BLEE aisladas (6 de carne de vacuno, 13 de carne de cerdo, 127 de carne de ave y 2 de productos agrícolas), tanto entre las obtenidas en un mismo tipo de alimento, como por comparación entre los 4 tipos. De hecho, identificamos 100 serotipos distintos en las 148 cepas, de los que solo los siguientes 3 serotipos destacaron por su prevalencia y por estar presentes en más de un tipo de alimento: 9 cepas O153:H10 (7 de carne de ave, 1 de carne de vacuno y 1 de carne de cerdo); 9 cepas O25:H4 (7 de carne de ave y 2 de carne de cerdo); y 8 cepas ONT:HNM (6 de carne de ave, 1 de cerdo y 1 de producto agrícola).

En total, se identificaron 50 clonotipos entre las 137 cepas analizadas por clonotipado (no se analizaron las 7 cepas que perdieron el gen *bla*_{CTX} ni las 4 cepas *fimH* negativas), de los que solo 2 clonotipos fueron identificados en cepas de carne de vacuno, cerdo y ave: CH11-54 en 19 cepas del filogrupo A, incluidas las 9 cepas O153:H10 (17 de carne de ave, 1 de carne de vacuno y 1 de carne de cerdo) y CH45-97 en 11 cepas del filogrupo D, en su mayoría portadoras del antígeno H4 (7 de carne de ave, 3 de carne de cerdo y 1 de carne de vacuno). Cinco de los 6 clonotipos identificados en las cepas de carne de vacuno y 7 de los 9 identificados en las cepas de carne de cerdo, estaban presentes entre los 46 clonotipos identificados en carne de ave (Tabla 87).

Al comparar los 50 clonotipos identificados en las cepas aisladas de alimentos del presente estudio, con los clonotipos identificados en 372 cepas de una colección de hemocultivos del LREC, encontramos que 28 de los 50 clonotipos habían sido previamente detectados en las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales de origen humano (datos no publicados). Sin embargo, 22 de los 50 clonotipos solo los asociamos a alimentos (19 clonotipos a cepas de carne de pollo, 2 clonotipos a cepas de carne de cerdo, 1 clonotipo a productos agrícolas, y 1 clonotipo detectado en cepas de carne de pollo y de vacuno) (Tabla 87).

Tabla 87. Relación de los 50 clonotipos de 137 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de alimentos

Clonotipo	Nº cepas (n=137)	Origen (Nº de cepas)
CH11-54•	19	pollo (17) - cerdo (1) - vacuno (1)
CH45-97•	11	pollo (7) - cerdo (3) - vacuno (1)
CH40-22•	10	pollo (8) - cerdo (2)
CH11-24•	6	pollo (6)
CH11-34	6	pollo (6)
CH31-54•	6	pollo (6)
CH4-32•	4	pollo (4)
CH41-35•	4	pollo (4)
CH4-31•	3	pollo (2) - cerdo (1)
CH41-86•	3	pollo (2) - cerdo (1)
CH11-137•	3	pollo (1) - cerdo (2)
CH11-30•	3	pollo (2) - vacuno (1)
CH65-32•	3	pollo (2) - vacuno (1)
CH4-121•	3	pollo (3)
CH11-23•	3	pollo (3)
CH276-108	3	pollo (3)
CH632-54	3	pollo (3)
CH4-58•	2	pollo (1) - cerdo (1)
CH7-25	2	pollo (1) - vacuno (1)
CH4-26	2	pollo (2)
CH4-27•	2	pollo (2)
CH4-38	2	pollo (2)
CH11-27•	2	pollo (2)
CH19-469	2	pollo (2)
CH26-270•	2	pollo (2)
CH29-38•	2	pollo (2)
CH29-86	2	pollo (2)
CH39-2•	2	pollo (2)
CH4-24•	1	pollo (1)
CH4-35•	1	pollo (1)
CH4-86	1	pollo (1)
CH4-366	1	pollo (1)
CH11-47	1	pollo (1)
CH11-167•	1	pollo (1)
CH23-31•	1	pollo (1)
CH23-221	1	pollo (1)
CH26-65	1	pollo (1)
CH27-27•	1	pollo (1)
CH27-41	1	pollo (1)
CH27-54•	1	pollo (1)
CH27-400	1	pollo (1)
CH31-27	1	pollo (1)
CH65-276	1	pollo (1)
CH88-27	1	pollo (1)
CH250-31	1	pollo (1)
CH153-39•	1	pollo (1)
CH6-53	1	cerdo (1)
CH7-470	1	cerdo (1)
CH11-31•	1	vacuno (1)
CH19-87	1	p. agrícolas (1)

•Clonotipos identificados en cepas humanas

También detectamos una alta variabilidad en el análisis de 21 genes de virulencia ligados al patotipo ExPEC, con un total de 61 perfiles de virulencia (de 1 a 13 genes) entre las 148 cepas BLEE aisladas (6 perfiles en las 6 cepas de carne de vacuno, 13 perfiles en las 13 cepas de carne de cerdo, 50 en las 127 de carne de pollo y 1 en las 2 cepas de productos agrícolas). Algunos genes no se detectaron en ninguna de las 148 cepas (*afa/draBC* y *hlyA*), o solo en algunas cepas de un único origen (*papEF* en 11 cepas de carne de ave; *sfa/focDE* y *cnf1* en 1 cepa de vacuno; *sat* en 3 cepas de carne de ave O6:H16/HNT; *kspM III* en 5 cepas de carne de ave O6:H16/HNT). Comparando la prevalencia individual de los genes en las cepas aisladas de los 3 tipos de carnes, solo encontramos diferencias significativas en la prevalencia de los genes *traT* (83,3% en cepas de carne vacuno y 76,9% en cepas de carne de cerdo vs. 28,3% en cepas de carne de pollo; $p < 0,05$ en ambas comparaciones) y *malX* (46% en cepas de carne de cerdo vs. 18,1% en cepas de carne de pollo; $p = 0,028$) (Tabla 88).

Tabla 88. Prevalencia de los genes de virulencia en las 148 cepas de *E. coli* productoras de BLEE

Genes*	Nº cepas positivas por origen de aislamiento (%)				TOTAL
	Carne de vacuno	Carne de Cerdo	Carne de ave	Producto agrícola	
<i>fimH</i>	6 (100%)	13 (100%)	124 (97,6%)	1 (50%)	144 (97,3%)
<i>fimAV_{MT78}</i>	1 (16,7%)	3 (23,1%)	38 (29,9%)	0	42 (28,4%)
<i>papEF</i>	0	0	11 (8,7%)	0	11 (7,4%)
<i>sfa/focDE</i>	1 (16,7%)	0	0	0	1 (0,7%)
<i>cnf1</i>	1 (16,7%)	0	0	0	1 (0,7%)
<i>cdtB</i>	0	2 (15,4%)	1 (0,8%)	0	3 (2%)
<i>sat</i>	0	0	3 (2,4%)	0	3 (2%)
<i>tsh</i>	1 (16,7%)	6 (46%)	32 (25,2%)	0	39 (26%)
<i>iroN</i>	3 (50%)	7 (53,8%)	55 (43,3%)	1 (50%)	66 (44,6%)
<i>iucD</i>	3 (50%)	6 (46%)	70 (55,1%)	0	79 (53,4%)
<i>iutA</i>	3 (50%)	6 (46%)	70 (55,1%)	0	79 (53,4%)
<i>kpsM II</i>	2 (33,3%)	3 (23,1%)	18 (14,2%)	0	23 (15,5%)
<i>KpsM III</i>	0	0	5 (3,9%)	0	5 (3,4%)
<i>cvaC</i>	1 (16,7%)	2 (15,4%)	30 (23,6%)	0	33 (22,3%)
<i>iss</i>	3 (50%)	8 (61,5%)	56 (44,1%)	1 (50%)	68 (45,9%)
<i>traT</i>	5 (83,3%)	10 (76,9%)	36 (28,3%)	0	57 (38,5%)
<i>malX</i>	1 (16,7%)	6 (46%)	23 (18,1%)	0	30 (20,3%)
<i>ibeA</i>	1 (16,7%)	2 (15,4%)	9 (7,1%)	0	12 (8,1%)
<i>usp</i>	0	2 (15,4%)	11 (8,7%)	0	13 (8,8%)

*Ninguna cepa fue positiva para los genes *afa/draBC*, *hlyA*

Curiosamente, detectamos el gen *eae* en 26 cepas (16,7%) *E. coli* productoras de BLEE aisladas de muestras de carnes (1 cepa de carne de vacuno, 1 cepa de carne de cerdo y 24 de carne de ave); y el tipado del gen identificó 2 subtipos: $\beta 1$ (en 22 cepas, 1 cepa de carne de vacuno, 1 cepa de carne de cerdo y 20 cepas de carne de ave) y $\epsilon 1$ (en 4 cepas

de carne de ave). Aunque las 26 cepas presentaban 13 serotipos, la mayoría (21 de las 26 cepas) se agrupaban en 3 clonotipos: CH11-54 (13 cepas), CH11-24 (5 cepas) y CH276-108 (3 cepas).

Aunque las 148 cepas aisladas pertenecían a los 4 filogrupos principales, el 71,6% de las cepas pertenecía a los filogrupos A y B1, típicamente vinculados a las cepas comensales de *E. coli*; mientras que el 28,4% pertenecía a los filogrupos típicamente extraintestinales B2 y D. Concretamente, las 11 cepas del filogrupo B2 (9 cepas O25b:H4, 1 cepa O120:H4 y 1 cepa O2:HNM) fueron aisladas de carne de cerdo y ave, e incluían las 10 cepas portadoras del mayor número de genes de virulencia (12-13 genes).

La predominancia de los filogrupos A y B1, entre el grupo heterogéneo de 148 cepas productoras de BLEE aisladas de alimentos, indicaría que los genes *bla*_{BLEE} se encuentran bien asentados entre cepas comensales de *E. coli*. Este hallazgo está en concordancia con lo observado por Zurfluh y colaboradores (2015), en base al 80,8% de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas de productos agrícolas en su estudio pertenecientes a los grupos filogenéticos A y B1. Y concretamente en carne de pollo, Kluytmans y colaboradores (2013) identificaron estos dos grupos filogenéticos en el 72% de las cepas productoras de BLEE, aisladas de dicho tipo de carne. En nuestro estudio, se observó esta predominancia independientemente del origen de aislamiento, aunque con diferencias (83,3% carne de vacuno, 53,8% carne de cerdo; 72,4% carne de pollo y 100% productos agrícolas). Valentin y colaboradores (2014) también encontraron esta predominancia en su macroestudio de 1.329 cepas de *E. coli* productoras de BLEE de origen animal y humano, siendo la prevalencia global de los filogrupos A y B1 del 62,8%, aunque con grandes diferencias entre las cepas de origen animal (80,5% de prevalencia) frente a las cepas de origen humano (43,5%); hay que tener en cuenta en esta diferencia que de las 635 cepas de origen humano, 422 procedían de procesos patológicos.

Veintiseis (17,6%) de las 148 cepas BLEE presentaban el estatus ExPEC (3 de las 6 cepas de carne de vacuno, 2 cepas de las 13 de carne de cerdo y 21 de las 127 de carne de ave). De las 26 cepas con estatus ExPEC, el 69,2% pertenecían a los mismos filogrupos (B2 y D) que los más comúnmente asociados con patología extraintestinal humana. La prevalencia de ExPEC entre las cepas aisladas de alimentos en este estudio es

comparable a la reportada (16%) por Xia y colaboradores (2011b) en un estudio de 1.275 cepas de *E. coli* aisladas de carne picada de vacuno, de carne picada de pavo, pechuga de pollo y chuletas de cerdo, realizado en EE.UU. También detectaron una prevalencia (66,5%) comparable a la nuestra de los filogrupos B2 y D entre las cepas con estatus ExPEC. Asimismo, Ghodousi y colaboradores (2015) detectaron una prevalencia de cepas ExPEC (16,7%) muy similar a la nuestra entre las 132 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de pollo en Italia.

Es importante resaltar que 1 de los 3 serotipos más prevalentes entre las 148 cepas BLEE de alimentos, el O153:H10, identificado en muestras de carne de vacuno, cerdo y pollo, lo habíamos detectado en estudios previos en alimentos y, lo que es más importante, también lo habíamos identificado en cepas aisladas de coprocultivos de pacientes con diarrea del HULA (Herrera, 2010). Todas las cepas identificadas, tanto en estudios previos como en este estudio, presentan una alta similitud, siendo todas del filogrupo A, portadoras del gen *eae*- β 1, positivas para los genes *fimH* y *fimAv*_{MT78}, pertenecientes al clonotipo CH11-54, y productoras de BLEE (la mayoría del tipo CTX-M-32). Curiosamente, solo detectamos 1 cepa O153:H10 de entre 17 que fuera productora de un tipo BLEE diferente (SHV-12), y se trata de un aislamiento de la muestra más reciente recogida en este estudio (noviembre del 2011).

En la Figura 38 se muestra el dendrograma generado del análisis de una selección de 12 cepas O153:H10 aisladas de alimentos en estudios anteriores, del presente estudio, y de coprocultivos humanos. Las 12 cepas de 3 orígenes distintos (humano, carne de pollo y carne de vacuno) muestran una similitud del 90,5%; mediante MLST constatamos que las 12 cepas pertenecían a la secuencia tipo ST10 determinado mediante secuenciación multilocus según el esquema de Achtman (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) (Herrera, 2010). Por tanto, hemos constatado el potencial zoonótico del grupo clonal O153:H10-A (ST10), prevalente en animales de producción e implicado en patología humana, portador de genes de virulencia diarreagénicos y de genes codificadores de BLEE. Este grupo clonal aparece altamente conservado a lo largo del tiempo, por lo que se trataría de un grupo clonal exitoso con importantes implicaciones para la salud pública.

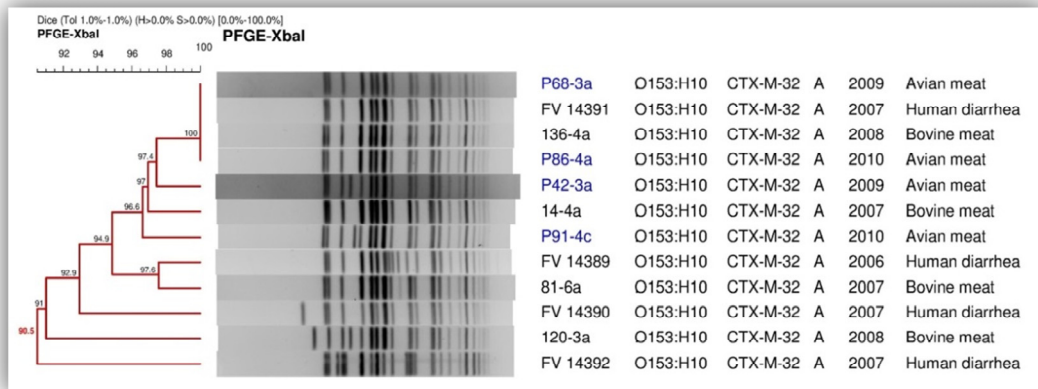


Figura 38. Dendrograma de los perfiles de PFGE de 12 cepas representativas del grupo clonal O153:H10-A (ST10) aisladas en este estudio (en color azul) y otros previos. A la derecha del dendrograma figuran los códigos de cepa, serotipo, tipo de BLEE, año de aislamiento y origen de cepa

Estudios previos han demostrado el vínculo existente entre determinados grupos clonales de *E. coli* aislados de animales de producción, o sus productos, y de patología humana. Mora y colaboradores (2009b) describieron el grupo clonal O1:H7/HNM-B2-ST95 en cepas aisladas de patología aviar y cepas de origen humano implicadas en casos de meningitis y septicemia, aisladas en diferentes fechas y orígenes geográficos, con una identidad >85% en sus perfiles de macrorrestricción. Cortés y colaboradores (2010) mostraron que 2 cepas pertenecientes al grupo clonal O25a:H4/HNM-D-ST648 (1 de patología humana y 1 de origen aviar), productoras ambas de CTX-M-32 y con el mismo perfil de genes de virulencia, presentaban un 96,6% de identidad en sus perfiles PFGE. También el grupo clonal O11:H4-D-ST117 prevalente entre cepas patógenas aviares, fue identificado en 1 cepa ExPEC humana aislada de un hemocultivo y que mostraba una similitud >85% en sus perfiles PFGE (Mora *et al.* 2012). Asimismo, Mora y colaboradores (2013) demostraron que las aves de producción son un reservorio de cepas ExPEC del grupo clonal O45:H7-B2-ST95 en base a los perfiles de macrorrestricción (>85%) y de genes de virulencia con respecto a cepas humanas aisladas de procesos septicémicos y uropatogénicos. Otros autores han demostrado las similitudes moleculares entre cepas aisladas de carne de ave y cepas aisladas de ITU en diferentes países como Canadá o los Países Bajos (Vincent *et al.* 2010; Overdeest *et al.* 2011; Bergeron *et al.* 2012; Kluytmans *et al.* 2013). Aunque son menos los trabajos, también se ha identificado similitud entre cepas aisladas de carne de cerdo y de origen humano (Jakobsen *et al.* 2012).

4.4. Grupo clonal ST131

4.4.1. Prevalencia

Investigamos la presencia del grupo clonal ST131 de *E. coli* en alimentos siguiendo el protocolo mostrado en la Tabla 36 (Métodos B-3 a B-6; página 118). Mediante PCR convencional, sobre los confluentes de los medios de cultivo detallados en dicho protocolo, se realizó la detección del gen que codifica para el antígeno O25b (*rfbO25b*) en 750 muestras de las 950 totales adquiridas en distintos establecimientos comerciales de la ciudad de Lugo (200 de carne picada de vacuno, 200 de carne picada de cerdo, 200 de pechuga de pollo y 150 productos agrícolas).

La prevalencia de detección del gen *rfbO25b* sobre los confluentes fue del 8,7% (65 de las 750 muestras analizadas), recuperándose finalmente colonias O25b en 48 de las 65 muestras positivas (6,4%) con un total de 50 colonias diferentes (en 2 muestras se recuperaron 2 tipos de colonias O25b). De las 50 cepas de *E. coli* O25b, 9 cepas (18%) eran *bla*_{BLEE} positivas (Tabla 89).

Al comparar la prevalencia de muestras con aislamiento positivo de colonias O25b en los 4 grupos de alimentos, observamos diferencias claramente significativas entre la carne de vacuno (1%) y productos agrícolas (0,7%) con respecto a las otras muestras cárnicas de cerdo y pollo (8,5% y 14%, respectivamente) ($p < 0,05$).

Tabla 89. Prevalencia de O25b en alimentos

Muestras	O25b detección ^a		O25b aislamiento ^b		TOTAL cepas	O25b BLEE
Carne picada de vacuno (n=200)	3	1,5%	2	1%	2	0
Carne picada de cerdo (n=200)	21	10,5%	17	8,5%	18	2
Pechuga de pollo (n=200)	40	20%	28	14%	29	7
Productos agrícolas (n=150)	1	0,7%	1	0,7%	1	0
Total (n=750)	65	8,7%	48	6,4%	50	9

^aDetección mediante PCR del gen *rfbO25b*; ^b Muestras con aislamiento de colonias

Las cepas multirresistentes de *E. coli* O25b:H4-B2, pertenecientes a la secuencia tipo ST131, han sido reconocidas a nivel mundial como importantes patógenos para los humanos (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008). Aunque este grupo clonal está asociado a la diseminación de CTX-M-15, muchas cepas son sensibles a las cefalosporinas y resistentes a las fluoroquinolonas (Leflon-Guibout *et al.* 2004). Los estudios científicos

han evidenciado que las cepas ST131 ya no solo circulan entre los humanos, sino también entre hospedadores animales (Cortés *et al.* 2010; Ewers *et al.* 2010; Mora *et al.* 2010).

Todavía no hay muchos estudios centrados en la presencia de este grupo clonal en alimentos o en animales de producción. La mayoría de los hallazgos derivan del análisis de cepas productoras de BLEE o de cepas ExPEC, y por lo que se deduce de los datos en trabajos recientes, las cepas ST131 presentes en los animales de producción y en los alimentos derivados, no están todavía asociadas a la diseminación de BLEE como es el caso de las cepas ST131 de origen humano. Destaca así el hecho de que estudios recientes, con prevalencias de BLEE en carne de ave superiores al 79%, no detectasen ninguna cepa de este grupo clonal (Overdevest *et al.* 2011; Egea *et al.* 2011, 2012). Sin embargo, sí fueron detectadas cepas O25b:H4-ST131 en otros estudios con menores prevalencias de *E. coli* productoras de BLEE en alimentos, como es el caso de Kawamura y colaboradores (2014) en su estudio realizado en Japón, que detectaron 4 (5,9%) de 68 muestras de carne de pollo positivas para O25b:H4 BLEE (2 cepas CTX-M-2, 1 CTX-M-8 y 1 SHV-12). Estos autores detectaron, por tanto, una prevalencia de cepas O25b:H4 productoras de BLEE superior a la encontrada en nuestro estudio en carne de pollo (3,5%), pero inferior en carne de cerdo (0% vs. 1% en nuestro estudio). Asimismo en carne de pollo, Ghodousi y colaboradores (2015) identificaron el grupo clonal O25b:H4-B2 en 4 (2,4%) de las 163 muestras analizadas de carne de pollo. También se ha detectado la presencia de ST131 en productos vegetales; Zurfluh y colaboradores (2015) aislaron 1 cepa ST131, en este caso productora de CTX-M-15, de un producto agrícola de importación en Suiza (0,6%).

La elevada prevalencia detectada en el presente estudio en carne de cerdo y pollo (8,5% y 14%, respectivamente), nos llevó a analizar los muestreos para ambos tipos de carnes, con objeto de averiguar si existía algún factor que explicase esa elevada prevalencia.

En el caso de la carne de ave, las 200 muestras de pechuga de pollo se obtuvieron en 2 muestreos de 100 muestras cada uno, realizados entre septiembre de 2009 - febrero de 2010 (Muestreo 1; n=100), y entre septiembre 2010 - diciembre 2010 (Muestreo 2; n=100). Como se indicó en el apartado de Material y Métodos, 170 de las 200 muestras

eran de pechuga de pollo fresca y 30 de pechuga envasada en atmósfera modificada. La prevalencia detectada en el Muestreo 2 (21 muestras de 100) fue significativamente superior a la del Muestreo 1 (7 muestras de 100) ($p=0,003$). Puesto que ambos muestreos se realizaron en el mismo periodo (entre otoño e invierno), descartamos el factor estacional como posible causa del incremento en la prevalencia; sin embargo, al analizar el tipo de presentación de la carne, encontramos una clara asociación de positividad con el envasado en atmósfera modificada (46,7% vs. 8,2%; $p<0,05$), y esto es así, debido a que las 30 muestras envasadas se concentraron en el segundo muestreo (Figura 39).

En el caso de la carne picada de cerdo, las 200 muestras se obtuvieron en 2 muestreos de 100 muestras cada uno realizados entre enero de 2011 - marzo de 2011 (Muestreo 1; $n=100$), y entre marzo 2012 - junio 2012 (Muestreo 2; $n=100$). Como se indicó en el apartado de Material y Métodos, 155 de las 200 muestras eran de carne picada fresca y 45 de carne picada envasada en atmósfera modificada. Curiosamente, para este tipo de carne, no encontramos diferencias significativas, ni entre el Muestreo 1 (10 muestras de 100) y el Muestreo 2 (7 muestras de 100) ($p=0,307$), ni entre el tipo de presentación de la carne (9% fresca vs. 6,7% envasada; $p=0,441$) (Figura 39).

De las 150 muestras de productos agrícolas (72 ensaladas envasadas y 78 productos frescos), la única cepa O25b aislada provenía de una ensalada envasada lista para el consumo.

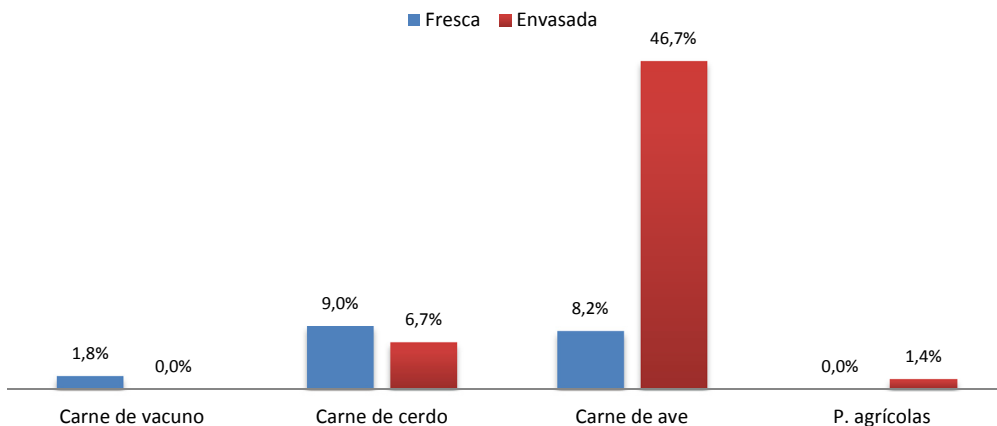


Figura 39. Prevalencias de *E. coli* O25b en productos frescos y envasados en los 4 grupos de alimentos

En relación con la elevada prevalencia en carne de ave, ya habíamos detectado previamente una creciente presencia del grupo clonal O25b:H4-B2 en patología aviar (0,2% entre 1991-2001; 1,5% entre 2007-2009; para llegar al 4% entre 2010-2014 de las cepas patógenas aviares aisladas) (Mora *et al.* 2010; datos no publicados).

4.4.2. Tipado de BLEE

En la Tabla 90 figuran las características de las 50 cepas de *E. coli* O25b aisladas de 48 muestras, de las que 9 cepas (18%) eran portadoras del gen *bla*_{CTX-M}. Mediante secuenciación se tipificaron como CTX-M-9 (7 cepas aisladas de carne de pollo) y CTX-M-1 (2 cepas aisladas de carne de cerdo). Ninguna de las 3 cepas O25b aisladas de carne de vacuno (2 cepas) y de productos agrícolas (1 cepa) resultó ser productora de BLEE, y ninguna de las 50 cepas fue positiva para el gen *bla*_{SHV}.

Cortés y colaboradores (2010) identificaron por primera vez el tipo CTX-M-9 entre cepas del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, en 1 cepa aislada en 2003 de heces de gallina. Y en nuestra área sanitaria, el tipo CTX-M-9 emerge recientemente (1er aislamiento en el año 2008), con una prevalencia del 3,5% entre 148 cepas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, aisladas entre los años 2006-2009 de pacientes del Hospital de Lugo; entre esas 148 cepas, el CTX-M-1 fue el menos prevalente (0,7%).

A pesar de la baja prevalencia global del tipo CTX-M-9 entre las cepas ST131 productoras de BLEE de origen humano, Blanco y colaboradores (2013) encontraron que este tipo CTX-M se asocia significativamente con las cepas del virotipo D; por el contrario, ninguna de las cepas del virotipo D resultó ser productora de CTX-M-15. Los resultados del presente estudio corroboran estas observaciones.

4.4.3. Serotipos y grupos filogenéticos

Mediante serotipado determinamos que las 50 cepas O25b eran del serotipo O25:H4, y mediante PCR confirmamos que todas pertenecían al filogrupo B2, como era de esperar al tratarse presuntamente de cepas del grupo clonal ST131.

Tabla 90. Cepas O25b:H4-B2 (ST131) aisladas de alimentos

Origen	Nº cepas	BLEE	Nº de cepas	Clonotipo	ST	Perfil	Perfil de virulencia	Nº de genes	GF	VIROTIPO	EXPEC	Perfil de Resistencia
C. de vacuno	2	-	2	CH40-22	131	1	P1-13	<i>fimH papG III catB iutA iucD iron KpsM II-K5 cvaC iss traT IbeA malX usp</i>	13	B2	D2	+ 1 CEF AMP
				CH40-22	131	1	P2-12	<i>fimH sfa/facDE iutA iucD iron KpsM II-K1 iss traT IbeA malX usp tsh</i>	12	B2	D4	+ 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FOX AMC AMP GEN TOB NAL SXT
P. Agrícolas	1	-	1	CH40-22	131	1	P3-6	<i>fimH kpsM II-K2 cvaC traT IbeA usp</i>	6	B2	D-NT	- 1 CEF
				CH40-22	131	1	P4-15	<i>fimH papG III crf1 catB hlyA iutA iucD iron KpsM II-K5 cvaC iss traT IbeA malX usp</i>	15	B2	D-NT	+ 1 AMP SXT
C. de porcino	1	-	1	CH40-22	131	1	P5-14	<i>fimH papG III crf1 catB iutA iucD iron KpsM II-K5 cvaC iss traT IbeA malX usp</i>	14	B2	D-NT	+ 1 CEF CFZ AMP NAL SXT
	2	-	2	CH40-161	131	2	P12-14	<i>fimH papG III crf1 hlyA iutA iucD iron KpsM II-K5 cvaC iss traT IbeA malX usp</i>	14	B2	D5	+ 1 CEF AMP NAL SXT
	4	-	4	CH40-298	131							+ 1 CEF AMP NAL
	1	-	1	CH40-380	131	8	P1-13	<i>fimH papG III catB iutA iucD iron KpsM II-K5 cvaC iss traT IbeA malX usp</i>	13	B2	D2	+ 1 CEF CFZ AMP
C. de ave	3	-	3	CH40-22	131							+ 1 CEF AMP NAL
	1	-	1	CH40-22	131	1	P6-12	<i>fimH iutA iucD iron KpsM II-K1 cvaC iss traT IbeA malX usp tsh</i>	12	B2	D4	+ 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP NAL CIP SXT
	1	-	1	CH40-22	131	1	P7-12	<i>fimH papG III crf1 hlyA iron KpsM II-K5 cvaC iss traT IbeA malX usp</i>	12	B2	D5	+ 1 AMP NAL
	1	-	1	CH40-22	131	1	P6-12	<i>fimH iutA iucD iron KpsM II-K1 cvaC iss traT IbeA malX usp tsh</i>	12	B2	D4	+ 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP
	1	-	1	CH40-22	131	1	P13-12	<i>fimH papG III crf1 hlyA iutA iucD kpsM II-K5 cvaC traT IbeA malX usp</i>	12	B2	D5	+ 1 CEF CFZ CXM CTX CAZ FEP AMP GEN TOB NAL SXT
	1	-	1	CH40-22	131	1	P8-10	<i>fimH iutA iucD iron KpsM II-K1 iss traT IbeA malX usp</i>	10	B2	D4	+ 1 AMP GEN TOB NAL
	1	-	1	CH40-22	131	1	P9-8	<i>fimH iron KpsM II-K1 iss traT IbeA malX usp</i>	8	B2	D4	- 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
	6	-	6	CH40-22	131	6	P6-12	<i>fimH iutA iucD iron KpsM II-K1 cvaC iss traT IbeA malX usp tsh</i>	12	B2	D4	+ 1 CEF NAL SXT 2 CEF AMP GEN TOB NAL SXT 1 AMP GEN TOB
	1	-	1	CH40-22	131	1	P10-12	<i>fimH iutA iucD iron KpsM II-K5 cvaC iss traT IbeA malX usp tsh</i>	12	B2	D-NT	+ 1 CEF CFZ CXM FOX AMC AMP
	7	-	7	CH40-22	131	7	P6-12	<i>fimH iutA iucD iron KpsM II-K1 cvaC iss traT IbeA malX usp tsh</i>	12	B2	D4	+ 4 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP NAL SXT 2 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP GEN NAL SXT 1 CEF CFZ CXM CTX FEP AMP
TOTAL	50	9	50					11,6			48	50

4.4.4. Genes de virulencia

Las 50 cepas fueron además caracterizadas mediante PCR para la presencia de 21 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas ExPEC. Adicionalmente, las cepas fueron analizadas para aquellos genes de virulencia diarreagénicos (incluido el gen *eae*) a los que hubiera sido positiva (en su caso) la muestra de alimento.

Las 50 cepas O25b:H4-B2 presentaron un total de 13 perfiles de virulencia (P1-P13; Tabla 90) de entre 6 y 15 genes, aunque la mayoría (36 cepas; 72%) eran positivas para 11 o más genes de virulencia (media de las 50 cepas=11,6 genes). La cepa O25b:H4-B2 aislada de una muestra de ensalada envasada fue la que presentó el menor número de genes de virulencia (6 genes). Encontramos una diferencia significativa entre las cepas aisladas de carne de cerdo y de pollo, en relación con el número de genes de virulencia, de manera que el 88,9% de las cepas de origen porcino presentaron 12 o más genes de virulencia frente al 48,3% de las cepas de carne de pollo ($p=0,005$) (Tabla 91).

De los 21 genes ExPEC analizados, 10 fueron detectados en la mayoría de las cepas: *fimH* (100%), *iroN* (96%), *iucD* (94%), *iutA* (94%), *kpsM II* (100%), *iss* (96%), *traT* (100%), *malX* (98%), *ibeA* (100%) y *usp* (100%). En contraste, en ninguna de las 50 cepas O25b:H4-B2 fueron identificados los genes *fimAv*_{MT78}, *afa/draBC*, *sat* y *kpsM III* (Tabla 91).

El 96% de las cepas (48 de 50) cumplían el criterio de estatus ExPEC, ya que presentaron 2 o más de los 5 genes de virulencia (*papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iutA* y *kpsM II*) de acuerdo con la definición de Johnson y colaboradores (2003a). Solo la cepa aislada de producto agrícola y 1 cepa aislada de carne de cerdo no cumplían este criterio.

Encontramos diferencias significativas en la prevalencia de 7 genes al comparar las 18 cepas O25b:H4-B2 aisladas de carne picada de cerdo, con las 29 cepas aisladas de pechuga de pollo (Tabla 91). En las cepas aisladas de carne de cerdo fue significativamente superior la prevalencia de los genes *papEF* (*papG III* positivas) (77,8% vs. 0%), *cnf1* (33,3% vs. 0%), *hlyA* (27,8% vs. 0%), *kpsM II-K5* (77,8% vs. 3,4%) y *cvaC* (88,9% vs. 48,3%) ($p<0,05$ para todas las comparaciones); mientras que las cepas aisladas de carne de pollo presentaban una mayor prevalencia para los genes *kpsM II-K1* (96,6% vs. 22,2%) y *tsh* (62,1% vs. 11,1%) ($p<0,05$ para ambas comparaciones).

Además, al comparar las 9 cepas O25b:H4-B2 productoras de BLEE con las 41 no productoras de BLEE, encontramos que las cepas *papEF* (*papG* III positivas) se correspondían con 15 (36,6%) de las 41 cepas no productoras de BLEE vs. 0% de las BLEE; y que 8 (88,8%) de las 9 cepas BLEE eran portadoras del gen *tsh* frente a 13 (31,7%) de las 41 no productoras de BLEE ($p < 0,05$ para ambas comparaciones). De estos análisis comparativos concluimos que existe una asociación significativa del gen *papG* III con las cepas O25b:H4-B2 de origen porcino no productoras de BLEE, y del gen *tsh* con las cepas O25b:H4-B2 de origen aviar productoras de BLEE.

Tabla 91. Prevalencia de genes de virulencia en las 50 cepas O25b:H4-B2 (ST131) aisladas de alimentos

Genes de virulencia	Total positivas		Carne de vacuno n=2		P. agrícolas n=1		Carne de cerdo n=18 (2 cepas BLEE)		Carne de pollo n=29 (7 cepas BLEE)		Cerdo vs. Pollo Valor de p^a
Adhesinas											
<i>fimH</i>	50	100%	2	100%	1	100%	18	100,0%	29	100%	
<i>fimAV_{MT78}</i>	0	0%	0	0%	0	0%	0	0,0%	0	0%	
<i>papEF</i>	15	30%	1	50%	0	0%	14	77,8%	0	0%	0,000
<i>papG</i> III	15	30%	1	50%	0	0%	14	77,8%	0	0%	0,000
<i>sfa/focDE</i>	1	2%	1	50%	0	0%	0	0,0%	0	0%	
<i>afa/draBC</i>	0	0%	0	0%	0	0%	0	0,0%	0	0%	
Toxinas											
<i>cnf1</i>	6	12%	0	0%	0	0%	6	33,3%	0	0%	0,002
<i>cdtB</i>	11	22%	1	50%	0	0%	10	55,6%	0	0%	0,000
<i>sat</i>	0	0%	0	0%	0	0%	0	0,0%	0	0%	
<i>hlyA</i>	5	10%	0	0%	0	0%	5	27,8%	0	0%	0,006
Sideróforos											
<i>iraN</i>	48	96%	2	100%	0	0%	17	94,4%	29	100%	
<i>iucD</i>	47	94%	2	100%	0	0%	16	88,9%	29	100%	
<i>iutA</i>	47	94%	2	100%	0	0%	16	88,9%	29	100%	
Cápsula											
<i>kpsM</i> II	50	100%	2	100%	1	100%	18	100,0%	29	100%	
<i>kpsM</i> II-K2	1	2%	0	0%	1	100%	0	0,0%	0	0%	
<i>kpsM</i> II-K5	16	32%	1	50%	0	0%	14	77,8%	1	3,4%	0,000
<i>neuC</i> -K1	33	66%	1	50%	0	0%	4	22,2%	28	96,6%	0,000
<i>kpsM</i> III	0	0%	0	0%	0	0%	0	0,0%	0	0%	
Varios											
<i>cvaC</i>	32	64%	1	50%	1	100%	16	88,9%	14	48,3%	0,005
<i>iss</i>	48	96%	2	100%	0	0%	17	94,4%	29	100%	
<i>traT</i>	50	100%	2	100%	1	100%	18	100,0%	29	100%	
<i>malX</i>	49	98%	2	100%	0	0%	18	100,0%	29	100%	
<i>ibeA</i>	50	100%	2	100%	1	100%	18	100,0%	29	100%	
<i>usp</i>	50	100%	2	100%	1	100%	18	100,0%	29	100%	
<i>tsh</i>	21	42%	1	50%	0	0%	2	11,1%	18	62,1%	0,006
Estatus ExPEC	48	96%	2	100%	0	0%	17	94,4%	29	100%	
Cepas con ≥ 12 genes de virulencia	32	64%	2	100%	0	0%	16	88,9%	14	48,3%	0,005
Media (rango) de genes de virulencia	11,6 (6-15)		12,5 (12-13)		6		12,6 (8-15)		11,1 (10-12)		

Negrita: dato estadísticamente significativo

^a Para cepas de carne de cerdo vs. cepas de carne de pollo. Únicamente se muestran los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$)

Las diferencias detalladas en el párrafo anterior, en relación con la prevalencia y asociación de determinados genes de virulencia, se traducen en la presencia de

determinados virotipos según el esquema desarrollado por Dahbi y colaboradores (2014). Las 50 cepas O25b:H4-B2 del estudio eran positivas para el gen *ibeA*, por lo que, según dicho esquema, todas se corresponden con el virotipo D, y dentro de este virotipo detectamos cepas D4 (33 cepas; 66%), D2 (9 cepas; 18%), D5 (4 cepas; 8%) y D no tipables (D-nt, 4 cepas; 8%) (Tabla 90). Las 2 cepas aisladas de carne de vacuno pertenecían, cada una, a los virotipos D2 y D4; la cepa aislada de ensalada envasada era D-nt; las cepas aisladas de carne de cerdo presentan un perfil heterogéneo: virotipo D2 (8 cepas; 44,4%), D4 (4 cepas; 22,2%), D5 (4 cepas, 22,2%) y D-nt (1 cepa; 11,1%); y por el contrario, la mayoría de las cepas aisladas de carne de ave mostraban a un único virotipo: D4 (28 cepas; 96,6%) y D-nt (1 cepa; 3,4%).

Por último, comparamos los perfiles de virulencia de las 9 cepas O25b:H4-B2 productoras de BLEE con el resto de cepas productoras de BLEE no pertenecientes al grupo grupo clonal O25b:H4-B2 (Tabla 92); ambos grupos están englobados en las 148 cepas recogidas en la Tabla 88 del apartado 4.3.7 (página 220).

Tabla 92. Cepas productoras de BLEE (O25b y no O25b) aisladas de alimentos

Genes*	Nº cepas positivas (%)		BLEE O25b vs. BLEE no O25b Valor de p
	BLEE O25b n=9	BLEE no O25b n=139	
<i>fimAV_{MT78}</i>	0	42 (30,2%)	0,045
<i>iroN</i>	9 (100%)	57 (41%)	0,001
<i>iucD</i>	8 (88,9%)	71 (51,1%)	0,027
<i>iutA</i>	8 (88,9%)	71 (51,1%)	0,027
<i>kpsM II</i>	9 (100%)	14 (10,1%)	0,000
<i>cvaC</i>	8 (88,9%)	25 (18%)	0,000
<i>iss</i>	9 (100%)	59 (42,4%)	0,001
<i>traT</i>	9 (100%)	48 (34,5%)	0,000
<i>malX</i>	9 (100%)	21 (15,1%)	0,000
<i>ibeA</i>	9 (100%)	3 (2,2%)	0,000
<i>usp</i>	9 (100%)	4 (2,9%)	0,000
<i>tsh</i>	8 (88,9%)	31 (22,3%)	0,000
Estatus ExPEC	8 (88,9%)	18 (12,9%)	0,000
Media de genes de virulencia	11,6 (8-12)	4,4 (0-13)	

*Figuran únicamente los genes con diferencias significativas entre ambos grupos BLEE (O25b y no O25) ($p < 0,05$)

Encontramos diferencias significativas en la prevalencia de 12 genes de virulencia, de manera que en el grupo de las 9 cepas O25b:H4-B2 productoras de BLEE, los genes *iroN*, *iutA*, *iucD*, *kpsM II*, *cvaC*, *iss*, *traT*, *malX*, *ibeA*, *usp* y *tsh* fueron significativamente más prevalentes ($p < 0,05$), y solo el gen *fimAV_{MT78}* fue significativamente más prevalente en el grupo de las 139 cepas productoras de BLEE no O25b (Tabla 92). Como consecuencia de estas diferencias, las cepas el grupo clonal O25b:H4-B2 aisladas de alimentos presentaban una media de genes de virulencia significativamente superior (11,6 vs. 4,4)

y la mayoría (88,9%) cumplía el criterio de estatus ExPEC frente al 12,9% de las 139 cepas productoras de BLEE no pertenecientes a este grupo clonal (Tabla 92).

Si comparamos los valores obtenidos para las cepas O25b:H4-B2 del virotipo D, aisladas en alimentos en este estudio, con las descritas por Blanco y colaboradores (2013) para cepas del virotipo D de origen humano, vemos que son comparables en cuanto al estatus ExPEC (96% para las 50 cepas de alimentos, 88,9% para las 9 cepas productoras de BLEE vs. 100% de las cepas BLEE del virotipo D humanas), pero diferentes en relación a la media de genes de virulencia, siendo superior en las cepas de origen humano (11,6 vs. 16,8). Además, comparando con los datos de Blanco y colaboradores (2013), las mayores diferencias de prevalencia entre los genes de virulencia son debidas a la asociación de los genes *papG* III, *cnf1*, *cdtB*, *hlyA* y *kpsM* II-K5 con cepas de origen humano (por tanto asociadas a virotipos D2 y D5) y, globalmente, la asociación de *kpsM* II-K1, *cvaC* y *tsh* (por tanto al virotipo D4) con las cepas de alimentos. Curiosamente, los genes asociados a las cepas de origen humano son significativamente más prevalentes en cepas O25b:H4-B2 aisladas de carne de cerdo con respecto a la carne de pollo (lo que indicaría una mayor similitud con cepas de origen humano), mientras que *kpsM* II-K1 y *tsh* son significativamente más prevalentes en cepas aisladas de carne de pollo.

4.4.5. Clonotipos

El clonotipado de las 50 cepas del grupo clonal O25b:H4-B2 reveló 4 clonotipos distintos, aunque la mayoría de las cepas presentaba el clonotipo CH40-22 (43 cepas), los otros clonotipos se correspondían con CH40-298 (4 cepas), CH40-161 (2 cepas) y CH40-380 (1 cepa).

Los 4 clonotipos detectados en cepas aisladas de alimentos están asociados a la secuencia tipo ST131, determinado mediante secuenciación multilocus según el esquema de Achtman (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). Comparando estos clonotipos con nuestra colección LREC de cepas del grupo clonal ST131 aisladas de diferentes orígenes, comprobamos que con la excepción del CH40-380 solo identificado en cepas de origen porcino, los otros 3 (CH40-22, CH40-161 y CH40-298) también habían sido detectados en cepas ST131 de origen humano. Es importante destacar que

mientras el clonotipo CH40-22 es el segundo más frecuente entre cepas ST131 humanas (después del CH40-30), los clonotipos CH40-161 y CH40-298 solo los hemos encontrado, cada uno, en 1 única cepa de entre una colección de 367 cepas ST131 aisladas de patología humana (datos no publicados).

La predominancia del clonotipo CH40-22 detectada en este estudio está en concordancia con los datos observados por Blanco y colaboradores (2013), que identificaron este clonotipo en todas cepas de origen humano del virotipo D en un análisis representativo de 130 cepas ST131 productoras de BLEE aisladas de 44 hospitales españoles.

Es importante destacar que ninguna de las 50 cepas O25:H4-B2 aisladas de alimentos en esta tesis presentó el clonotipo CH40-30, que es el predominante entre las cepas ST131 (tanto BLEE como no BLEE) causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos a nivel mundial (Blanco *et al.* 2013; Price *et al.* 2013; Dahbi *et al.* 2014; Nicolas-Chanoine *et al.* 2014; Mathers *et al.* 2015).

4.4.6. Patrones de resistencia de las cepas O25b:H4-B2 (ST131)

El estudio de sensibilidad a los antimicrobianos de las 50 cepas de *E. coli* O25b:H4-B2 (ST131) mediante el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 Plus reveló 26 patrones de resistencia distintos (P1-P26) (Tabla 93). Con la salvedad de 1 cepa aislada de una muestra de ensalada envasada con resistencia únicamente a la cefalotina, el resto de cepas presentaron patrones de multirresistencia de entre 2 y 12 de los 17 antimicrobianos ensayados. El patrón de multirresistencia más prevalente fue el P14, frente a 4 antibióticos (AMP, GEN, TOB, NAL) detectado en 11 cepas (22%) (1 aislada de carne de cerdo y 10 de carne de pollo).

Analizando las prevalencias de resistencia por antimicrobiano, las mayores prevalencias fueron frente a la ampicilina (48 cepas; 96%), a la cefalotina (32 cepas; 64%) y al ácido nalidíxico (32 cepas; 64%). Solo 1 cepa, aislada de carne de cerdo, presentó resistencia frente a la ciprofloxacina (Tabla 93), aunque hay que indicar que adicionalmente 5 cepas (2 de carne de cerdo y 3 de carne de pollo) mostraron valores intermedios de resistencia frente a este antibiótico.

De acuerdo con lo observado por Blanco y colaboradores (2013), la prevalencia de las cepas resistentes a la ciprofloxacina estaría vinculada con el clonotipo CH40-30, y a su vez con los virotipos A, B y C; mientras que esta prevalencia sería significativamente más baja para las cepas de otros clonotipos, y por tanto para las cepas del virotipo D. En nuestro estudio todas las cepas fueron del virotipo D y en su mayoría CH40-22; y de las 9 cepas O25b:H4-B2 (ST131) productoras de BLEE, solo 3 cepas aisladas de carne de pollo presentaron valores intermedios de resistencia frente a la ciprofloxacina.

Tabla 93. Patrones de resistencia de las cepas de *E. coli* O25b:H4-B2 (ST131) aisladas de alimentos

Patrón	Nº de cepas (%)	V-P-A-PA	Tipo de BLEE	CEF	CFZ	CXM	CTX	CAZ	FEP	FOX	AMC	AMP	GEN	TOB	NAL	CIP	SXT	*Nº
1	1 2,0%	1-0-0-0	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	-	R	12
2	1 2,0%	0-1-0-0	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	-	R	11
3	1 2,0%	0-1-0-0	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	-	R	R	R	10
4	1 2,0%	0-0-1-0	-	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	-	-	-	R	9
5	2 4,0%	0-0-2-0	CTX-M-9	R	R	R	R	-	R	-	-	R	R	-	R	-	R	9
6	4 8,0%	0-0-4-0	CTX-M-9	R	R	R	R	-	R	-	-	R	-	-	R	-	R	8
7	4 8,0%	0-0-4-0	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	-	-	-	-	-	8
8	1 2,0%	0-1-0-0	CTX-M-1	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	-	-	-	-	7
9	2 4,0%	0-0-2-0	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R	-	R	6
10	1 2,0%	0-0-1-0	-	R	R	R	-	-	-	R	R	R	-	-	-	-	-	6
11	2 4,0%	0-1-0-0	CTX-M-1	R	R	R	R	-	R	-	-	R	-	-	-	-	-	6
		0-0-1-0	CTX-M-9	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	6
12	1 2,0%	0-1-0-0	-	R	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-	R	-	R	5
13	1 2,0%	0-0-1-0	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R	-	-	5
14	11 22,0%	0-1-10-0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R	-	-	4
15	1 2,0%	0-1-0-0	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	R	-	R	4
16	2 4,0%	0-2-0-0	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	R	-	-	3
17	1 2,0%	0-1-0-0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	R	-	R	3
18	1 2,0%	0-1-0-0	-	R	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	3
19	2 4,0%	0-2-0-0	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	3
20	1 2,0%	0-0-1-0	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	R	3
21	1 2,0%	0-0-1-0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	-	-	-	3
22	1 2,0%	0-0-1-0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	R	-	-	3
23	2 4,0%	1-1-0-0	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	2
24	2 4,0%	0-2-0-0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	2
25	2 4,0%	0-2-0-0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	R	-	-	2
26	1 2,0%	0-0-0-1	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
TOTAL	50	2-18-29-1	10	32	20	18	17	8	11	7	7	48	21	17	32	1	20	(1-12)
%		4%-36%-58%-2%	20%	64%	40%	36%	34%	16%	22%	14%	14%	96%	42%	34%	64%	2%	40%	

CEF: cefalotina, CFZ: cefazolina, CXM: cefuroxima, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, FOX: Cefoxitina, AMC: Amoxicilina/clavulánico, AMP: Ampicilina, GEN: Getamicina, TOB: Tobramicina, NAL: Ácido Nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol.

V-P-A-PA= número de cepas de vacuno, porcino, ave y productos agrícolas

*Nº. Número de antibióticos frente a los que eran resistentes las cepas. Ninguna cepa presentó resistencia frente al imipenem (IMP), piperacilina/tazobactam (TZP) y fosfomicina (FOF)

Al comparar las 18 cepas O25b:H4-B2 (ST131) aisladas de carne picada de cerdo con las 29 cepas aisladas de pechuga de pollo (Tabla 94), encontramos que la prevalencia de

resistencias frente a aminoglucósidos, la amoxicilina/ácido clavulánico y la cefoxitina era significativamente superior en las cepas aisladas de pollo ($p<0,05$); además, la mayoría de las cepas de este origen (27 de 29; 93,1%) eran multirresistentes a 3 o más familias de antimicrobianos, frente al 55,6% de las cepas aisladas de carne de cerdo ($p<0,05$).

Tabla 94. Comparación de prevalencias de resistencia entre cepas de *E. coli* O25:H4-B2 (ST131) aisladas de carne de cerdo y carne de pollo

Resistencia antimicrobiana	Carne de cerdo n=18		C. de pollo n=29		Valor de p^*
•Penicilinas (AMP)	18	100%	28	96,6%	
•Quinolonas (NAL)	10	55,6%	21	72,4%	
•Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	9	50%	10	34,5%	
•Fluoroquinolonas (CIP)	1	5,6%	0	0%	
•Aminoglucósidos (GEN-TOB)	2	11,1%	18	62,1%	0,000
•Cefalosporinas (1ª - 4ª generación) (CEF-CFZ-CXM-CTX-CAZ-FEP)	12	66,7%	17	58,6%	
•Cefalosporinas de espectro extendido (CTX-CAZ-FEP)	4	22,2%	12	41,4%	
•Inhibidores de β -lactamasas (AMC-TZP)	0	0%	6	20,7%	0,044
•Cefamicina (FOX)	0	0%	6	20,7%	0,044
Multirresistentes a 3 o más familias	10	55,6%	27	93,1%	0,003
Multirresistentes a 2 familias	8	44,4%	2	6,9%	0,003
Resistentes a 1 familia	0	0%	0	0%	
Total resistentes	18	100%	29	100%	

* Únicamente se muestran los valores que resultaron estadísticamente significativos ($p<0,05$)

4.4.7. Perfiles de macrorrestricción obtenidos por PFGE de las cepas O25b:H4-B2 (ST131): comparación con cepas de origen humano

Se llevó a cabo la técnica de PFGE, de acuerdo con el protocolo estandarizado de PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol508c.pdf>), con objeto de definir los perfiles de macrorrestricción obtenidos con la enzima *Xba*I de las 50 cepas O25b:H4-B2 (ST131) aisladas en nuestro estudio. Las imágenes de los geles de PFGE fueron analizadas con el programa BioNumerics versión 5.0. para obtener el dendrograma que se muestra en la Figura 40.

Las 50 cepas O25b:H4-B2 (ST131) del presente estudio revelaron un total de 43 perfiles de macrorrestricción diferentes, con una similitud global de 63,4%. Se identificaron 7 cluster de identidad $\geq 85\%$ (I-VII), tres de los cuales incluían cepas aisladas de más de un tipo de alimento: cluster I (1 cepa aislada de carne de cerdo y 11 cepas de carne de pollo), cluster II (1 cepa de carne de cerdo y 1 de carne de pollo) y cluster VII (3 cepas de carne de cerdo y 1 de carne de vacuno).

En el dendrograma (Figura 40) se puede apreciar claramente la distribución de las cepas en función de sus perfiles de virulencia, o lo que es lo mismo, en función de su virotipo.

Así, el Grupo A, engloba 36 cepas con una identidad del 67,3%: todas las cepas del virotipo D4 (28 aisladas de carne de pollo, 4 de carne de cerdo y 1 de carne de vacuno), 2 cepas del virotipo D5 y 1 cepa D-nt; y el Grupo B engloba 14 cepas con una identidad del 68,3%: todas las cepas del virotipo D2 (8 aisladas de carne de cerdo y 1 de carne de vacuno), 3 cepas D-nt (2 de carne de cerdo y 1 de una lechuga envasada) y 2 cepas del virotipo D5 aisladas de carne de cerdo. Se puede apreciar, además, las asociaciones descritas en los apartados 4.4.4. (página 229) y 4.4.6. (página 233) en relación con los perfiles de genes de virulencia y patrones de resistencia, de manera que el virotipo D4 (*kpsM* II-K1) aparece claramente asociado con el origen aviar y la mayoría de las cepas son multirresistentes a 3 o más familias de antimicrobianos; mientras que los virotipos D2 (*papG* III, *cdtB*, *kpsM* II-K5) y D5 (*papG* III, *cnf1*, *hlyA*, *kpsM* II-K5) aparecen asociados al origen porcino, siendo el D2 en el que aparecen menos multirresistencias asociadas.

Teniendo en cuenta estas asociaciones, se podrían detectar y deducir las cepas que resultan de procesos de contaminación cruzada:

- **Cluster I:** cepa C19-4b (aislamiento de carne de cerdo), virotipo D4 y 100% de similitud con 3 cepas de origen aviar y >86% con otras 8 cepas de origen aviar del mismo cluster; posible contaminación cruzada con carne de pollo.
- **Cluster II:** cepa C59-6a (aislamiento de carne de cerdo), virotipo D4 y 87,3% de similitud con 1 cepa de origen aviar; posible contaminación cruzada con carne de pollo.
- **Cluster VII:** cepa 47-6a (aislamiento de carne de vacuno), virotipo D2 y 92,7% de similitud con 1 cepa de origen porcino; posible contaminación cruzada con carne de cerdo.

Podemos concluir, por tanto, que a pesar de que todas las cepas del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) aisladas de alimentos en este estudio eran *ibeA* positivas, mostraron una alta heterogeneidad tanto en sus perfiles de virulencia, como a nivel de tipado molecular, incluso dentro de los mismos virotipos D2, D4 y D5, los cuales mostraron asociaciones significativas con su origen de aislamiento. De nuevo hemos constatado que la herramienta de PFGE es de utilidad a la hora de determinar posibles orígenes de contaminación cruzada.

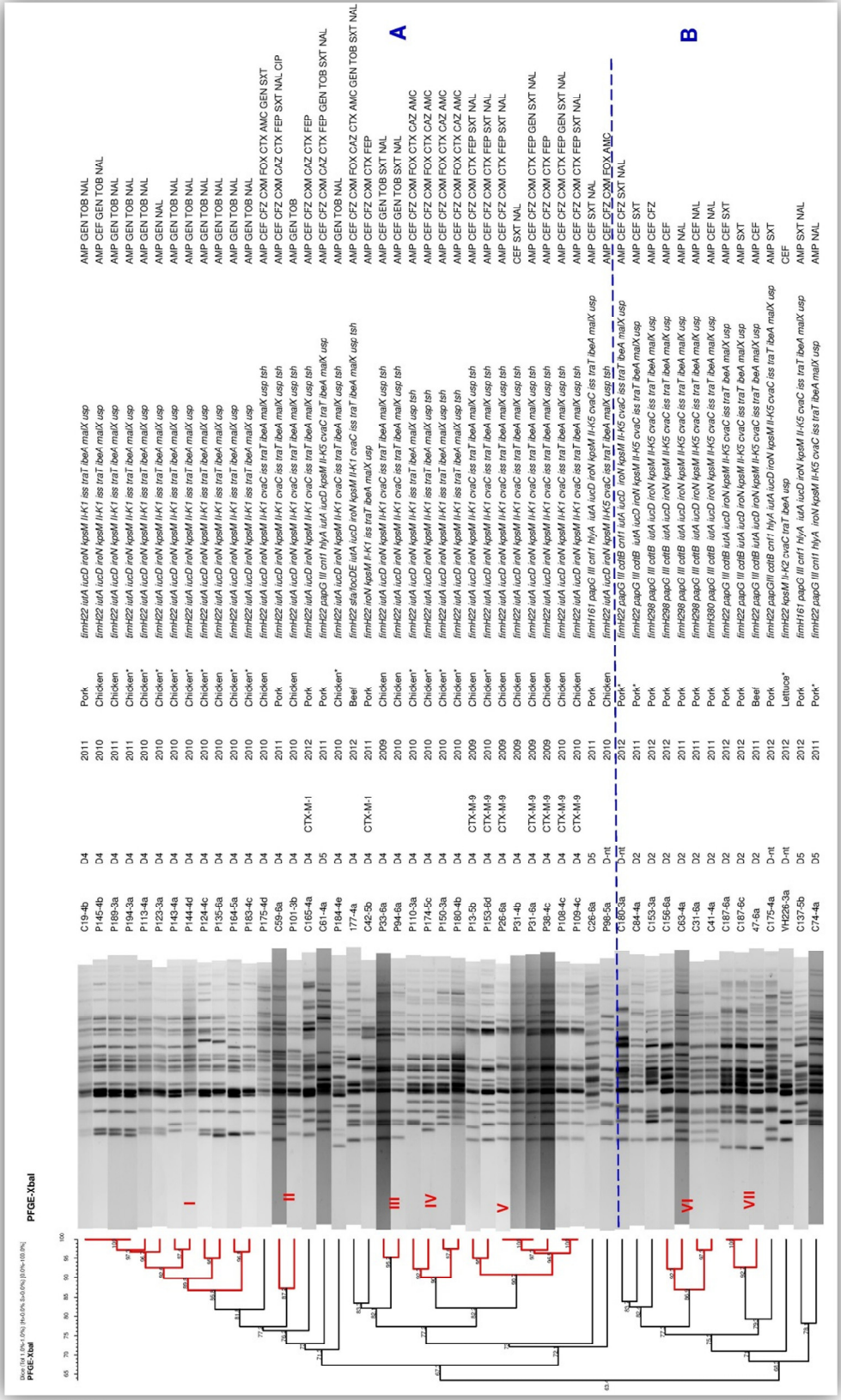


Figura 40. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 50 cepas O25b:H4-B2 (ST131) aisladas en el presente estudio. A la derecha del dendrograma figuran los códigos de cepa, virotipos, tipos de BLEE, año de aislamiento, tipo de muestra (*Alimentos envasados en atmósfera modificada), genes de virulencia y patrones de resistencia

Estudio comparativo con cepas O25b:H4-B2 (ST131) de otros orígenes

Con objeto de analizar similitudes y diferencias entre cepas pertenecientes O25b:H4-B2 (ST131), pero aisladas de diferentes orígenes, comparamos las cepas de este estudio con otras de nuestra colección. Al analizar 81 cepas de diferente procedencia (patología aviar, patología porcina, aves de producción sanas y animales silvestres), constatamos que todas las cepas de origen animal pertenecientes a este grupo clonal muestran el virotipo D (*ibeA* positivas; 90,1% de las 81 cepas) o son no tipables (NT; 9,9%). Además, confirmamos ciertas asociaciones por origen de aislamiento (94,7% de las cepas aisladas de patología aviar eran D4; 61,5% de las aisladas de patología porcina mostraban el virotipo D5; el 90,9% de los aislamientos de aves de producción sanas eran D4; y el 54,5% de las aisladas de animales silvestres mostraban el virotipo D-nt) (datos no publicados). Asimismo, comprobamos la implicación del virotipo D en patología humana, para ello analizamos una colección de 307 cepas pertenecientes a este grupo clonal aisladas de pacientes con sepsis (157 cepas) y con ITU (150 cepas); globalmente, el virotipo D (cepas *ibeA* positivas) era el más prevalente (29% de los aislamientos) después del virotipo C (34,5%), y dentro de este virotipo detectamos una mayor prevalencia del D5 (28,1%) seguido del D2 (24,7%), D4 (19,1%), D1 (14,6%) y D3 (13,5%) (datos no publicados).

Vincent y colaboradores (2010) fue el primero en describir la similitud entre una cepa O25b:H4-B2 (ST131) aislada de 250 muestras de carne de pollo en Canadá (0,4%) con una cepa de origen humano aislada de una ITU (100% de identidad en sus perfiles PFGE). En el presente estudio comparamos los perfiles de macrorrestricción de las 50 cepas O25b:H4-B2 (ST131) aisladas de alimentos con 179 cepas O25b:H4-B2-*ibeA* de origen humano y de patología aviar de la colección LREC. Encontramos que 14 cepas aisladas en el presente estudio de carne de cerdo y de carne de pollo (4 cepas de carne de cerdo, incluidas 2 del virotipo D2, 1 del virotipo D4 y 1 del virotipo D5; y 10 cepas de carne de pollo del virotipo D4) presentaban una similitud >85% con 16 cepas de nuestra colección LREC (14 aisladas de patología humana y 2 de patología aviar). En el dendrograma resultante se puede apreciar cómo las cepas se distribuyeron homogéneamente según su virotipo (D2, D5 y D4), con 5 cluster (I a V) de identidad >85% que incluyen cepas de distinto origen (Figura 41).

En el **cluster I** se agrupan 6 cepas del virotipo D2 con un 85,5% de identidad, incluidas 2 cepas aisladas de carne de cerdo y 4 de patología humana. Individualmente, cada una de las cepas de origen porcino presenta una similitud >90% con sendas cepas de origen humano. La alta similitud entre cepas de ambos orígenes apoyaría la hipótesis de la carne de cerdo como transmisora de cepas potencialmente patógenas para el hombre. Es interesante señalar que las 6 cepas fueron aisladas en distintos años (2009-2012), incluso de diferentes orígenes geográficos (1 cepa de origen humano, aislada en el 2009 en Barcelona) lo que indicaría la persistencia de este subtipo. También es importante destacar que las 2 cepas aisladas de carne de cerdo (en 2011 y 2012, respectivamente) presentan un alelo *fimH* diferente (el 298) que varía únicamente en 1 nucleótido con respecto al *fimH22*. El alelo *fimH298* solo lo hemos detectado en 1 cepa ST131 de origen humano (aislada de un hemocultivo en el 2010) de entre una colección de 367 cepas ST131 de patología humana, así como en estas 2 cepas de origen porcino.

En el **cluster II** se agrupan 2 cepas del virotipo D5 con un 92,7% de identidad, incluidas 1 cepa aislada de carne de cerdo y 1 de patología humana. Como en el cluster anterior, las 2 cepas se aislaron en periodos temporales distantes (2012 y 2010, respectivamente), lo que da idea de la persistencia de este subtipo, aunque en este caso en un mismo origen geográfico (Lugo). Es interesante señalar que el alelo *fimH161*, presente en ambas cepas, solo lo hemos detectado en esta cepa ST131 de origen humano (2010) de entre una colección de 367 cepas ST131 de patología humana, y en 3 cepas de origen porcino. Como en el cluster I, la alta similitud entre cepas de ambos orígenes apoyaría la hipótesis de la carne de cerdo como transmisora de cepas potencialmente patógenas para el hombre.

En el **cluster III** se agrupan 15 cepas del virotipo D4 con un 87,1% de identidad, incluidas 8 cepas aisladas de carne de pollo, 2 cepas de patología aviar y 5 cepas de patología humana. Individualmente, las cepas de origen aviar alcanzan >90% de identidad con cepas de origen humano, incluso el 100% en el caso de 2 cepas productoras de BLEE tipo CTX-M-9 (81 BA aislada en Barcelona en 2009 y P38-4c aislada de carne de pollo en 2009). Las 15 cepas de este cluster presentan perfiles de virulencia y macrorrestricción muy homogéneos, todas portan el alelo *fimH22*, y 14 de las 15 son además CTX-M-9. Las

cepas de este cluster fueron aisladas en el periodo 2008-2010 en diferentes orígenes geográficos. La presencia de cepas aisladas de patología aviar refuerza la hipótesis del papel de las aves en el ciclo de transmisión de cepas potencialmente patógenas para el hombre.

En el **cluster IV** se agrupan 5 cepas del virotipo D4 con un 87,6% de identidad, incluidas 2 cepas aisladas de carne de pollo y 3 cepas de patología humana (2 de Lugo y 1 de Barcelona), que fueron aisladas en el periodo 2009-2010. Como en el cluster III, las 5 cepas del cluster IV presentan perfiles de virulencia y macrorrestricción muy homogéneos, y todas portan el alelo *fimH22*.

Por último, el **cluster V** agrupa 2 cepas del virotipo D4, incluida 1 aislada de carne de cerdo y 1 de patología humana, con un 88,2% de identidad. Las 2 cepas son productoras de BLEE de diferente tipo (SHV-12 y CTX-M-1, respectivamente) y, curiosamente fueron aisladas en periodos de tiempo y orígenes geográficos dispares, pero presentan idéntico perfil de virulencia, siendo ambas negativas para el estatus ExPEC. Es interesante destacar que a pesar de compartir virotipo y alelo *fimH* con las cepas del cluster III y IV, mostraron una gran distancia genética (solo un 69,6% de identidad con dichos cluster).

Concluimos que la alta similitud encontrada entre ciertas cepas O25b:H4-B2 (ST131) aisladas en el presente estudio y cepas aisladas de patología humana apoyaría la hipótesis de que ciertos alimentos juegan un papel importante en la transmisión de este grupo clonal al hombre, fundamentalmente (aunque no exclusivamente), la carne de cerdo como transmisora de cepas del virotipo D2 y D5, y la carne de pollo como transmisora de cepas del virotipo D4.

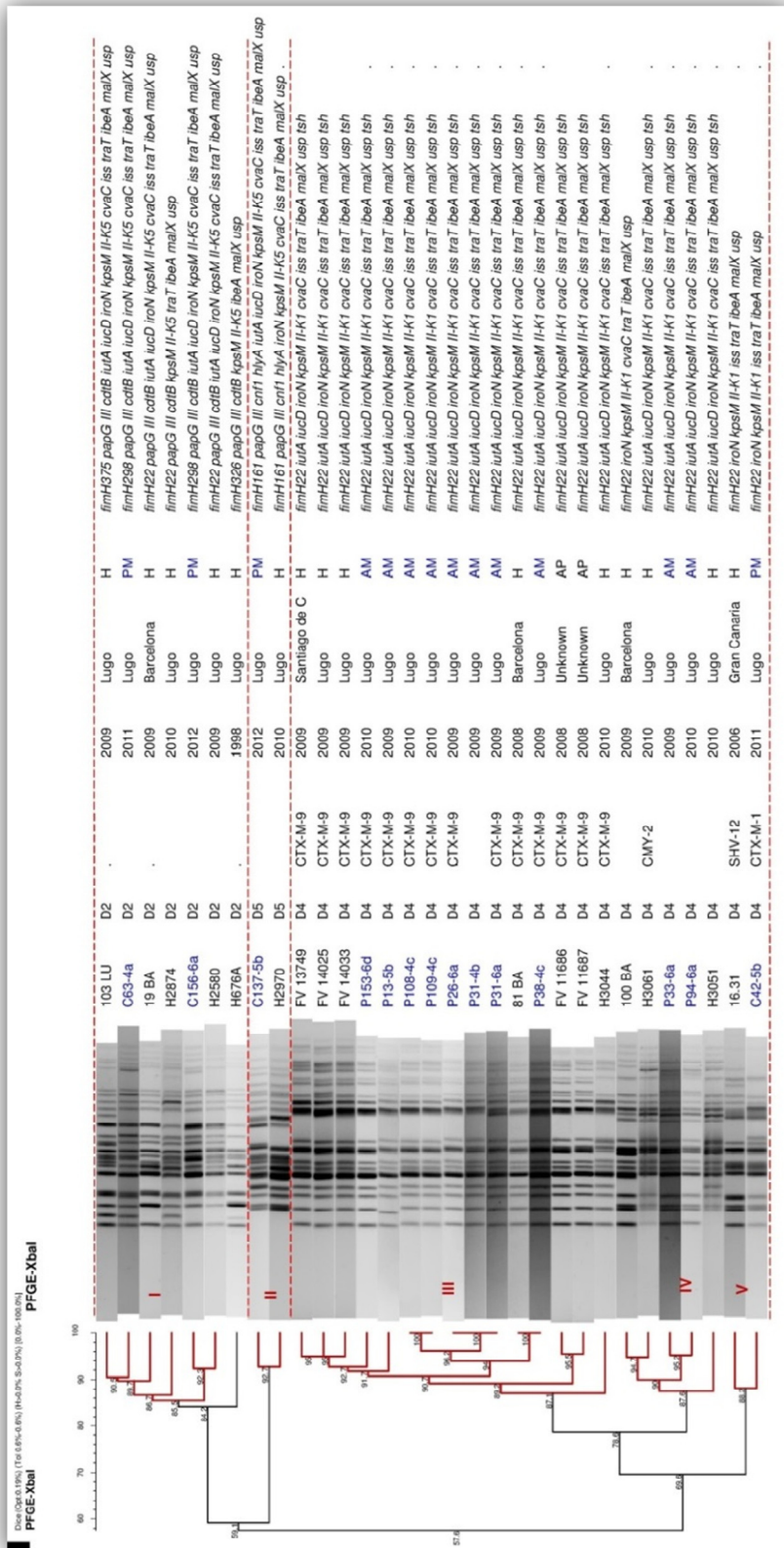


Figura 41. Dendrograma comparativo de los perfiles PFGE de 31 cepas del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) (14 aisladas de alimentos del presente estudio, en color azul, y 17 cepas de la colección LREC). A la derecha del dendrograma figuran los códigos de cepa, virotipos, tipos de BLEE, año de aislamiento, origen geográfico, origen de aislamiento (H= human, PM=pork meat, AM=avian meat, AP= avian pathology) y perfil de genes de virulencia

4.5. Valoración del riesgo microbiológico de los alimentos muestreados en la ciudad de Lugo

Tradicionalmente, las infecciones alimentarias englobaban exclusivamente aquellas que afectaban al tracto gastrointestinal y que eran producidas por patotipos clásicamente diarreagénicos, como ECVT, ECEP y ECET, principalmente. Sin embargo, el creciente número de estudios que vinculan ciertas cepas de *E. coli* aisladas de alimentos con las infecciones del tracto urinario, llevaron a ampliar esta definición, creando un nuevo término “infecciones del tracto urinario transmitidas por alimentos”, en inglés “foodborne UTI” o “FUTI” (Nordstrom *et al.* 2013).

Por otra parte, las cepas de *E. coli* productoras de BLEE suponen un problema cada vez mayor en relación con la salud pública. La creciente presencia de estas enzimas puede ser debida a la diseminación de clones bacterianos BLEE positivos, a la transferencia de plásmidos portadores de genes BLEE o al intercambio de genes codificadores de BLEE ligados a elementos móviles. Todas estas posibilidades hacen difícil identificar las rutas de transmisión y las fuentes de bacterias BLEE positivas. Los animales de producción, y los alimentos derivados de ellos, están reconocidos como portadores de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, y se consideran fuentes potenciales importantes para la colonización de los humanos (Valentin *et al.* 2014). Y no solo las fuentes de origen animal, también los productos agrícolas suponen una fuente nada despreciable de genes de resistencia a antibióticos (Zurfluh *et al.* 2015). La identificación y cuantificación de la contribución de las diferentes fuentes a las infecciones zoonóticas, o a la colonización humana, es un paso fundamental para reducir la exposición del consumidor a estos patógenos zoonóticos.

Finalmente, y en base a los objetivos del presente estudio, hicimos una estimación conjunta del número de muestras adquiridas en diferentes establecimientos de la ciudad de Lugo que supondrían un riesgo potencial desde el punto de vista microbiológico para la salud de los consumidores. Para ello valoramos la presencia en las muestras de alimentos de cepas de *E. coli* diarreagénicas, concretamente de cepas de ECVT con significación clínica (seropatotipos A, B, C y D), de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, y de cepas O25b:H4-B2 del grupo clonal pandémico ST131 productoras y no productoras de BLEE.

Globalmente, de las 950 muestras de alimentos analizadas, 166 (17,5%) resultaron positivas para el aislamiento de cepas que conllevan un riesgo potencial para la salud pública. Estas 166 muestras incluían 25 muestras positivas para el aislamiento de ECVT con significación clínica, 106 muestras portadoras de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (no O25b:H4-B2), y 48 muestras positivas para el aislamiento de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131). En 13 de las 166 muestras se aislaron 2 tipos de cepas potencialmente peligrosas para el consumidor (Figura 42).

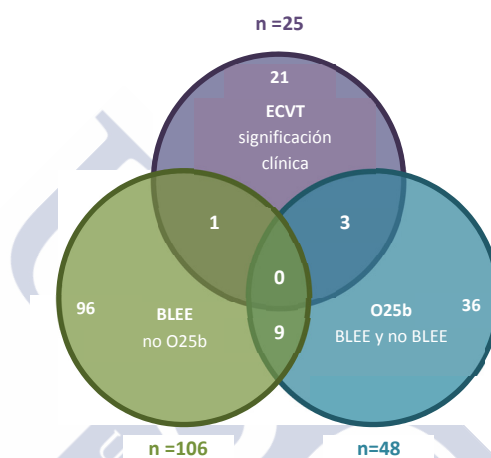


Figura 42. Correlación de muestras positivas para el aislamiento de cepas de *E. coli* con implicaciones para la salud pública: cepas de ECVT con significación clínica identificadas en 25 muestras (1 de las cuales era portadora de 1 cepa BLEE positiva no O25b:H4 y 3 muestras eran portadoras de cepas O25b:H4); cepas de *E. coli* productoras de BLEE no O25b:H4 identificadas en 106 muestras (9 de las cuales eran portadoras de cepas O25b:H4); cepas de *E. coli* del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) identificadas en 48 muestras

Por tipo de alimento, los datos señalan a las carnes como de especial riesgo microbiológico, puesto que de las 166 muestras portadoras de cepas potencialmente peligrosas, 161 eran de carne y 5 de productos agrícolas. Esto supone el 26,8% de las carnes muestreadas (161 de 600 muestras) y el 1,4% de los productos vegetales (5 de 350). Y como era de esperar, la carne de ave fue la que presentó una mayor prevalencia de este tipo de cepas (109 muestras; 54,5%), seguida de la carne de cerdo (34 muestras; 17%), y de la carne de vacuno (18 muestras; 9%).

En la Tabla 95 se correlacionan los 25 aislamientos de ECVT pertenecientes a los serototipos A, B, C y D con la presencia de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) y de cepas productoras de BLEE.

Tabla 95. Correlación de las 25 cepas ECVT con significación clínica con el aislamiento de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) y de cepas de *E. coli* productoras de BLEE

Tipo de muestra/código	Cepas ECVT con significación clínica				Cepas <i>E. coli</i> extraintestinales	
	NMP	Serotipo	Genes de Virulencia	eropatotip	O25b (BLEE y no BLEE)	BLEE
Vacuno/13	<10	O157:H7	<i>vt2c, eae-γ1, E-hlyA, stcE</i>	A	-	-
Vacuno/30	>999	O113:H21	<i>vt1a, vt2d</i>	C	-	-
		O26:H11	<i>vt1a, eae-β1, E-hlyA</i>	B	-	-
		ONT:H21	<i>vt1a, vt2c</i>	*	-	-
Vacuno/37	<10	ONT:H8	<i>vt1a, vt2a, E-hlyA, saa</i>	*	-	-
Vacuno/43	10-99	O157:H7	<i>vt1a, vt2c, eae-γ1, E-hlyA, stcE</i>	A	-	-
		O104:H7	<i>vt2a, E-hlyA, saa, subA</i>	D	-	-
Vacuno/44	100-999	O91:H21	<i>vt2a vt2d, E-hlyA, saa</i>	C	-	-
		O174:H21	<i>vt2c</i>	C	-	-
Vacuno/46	100-999	O157:H7	<i>vt2c, eae-γ1, E-hlyA, stcE</i>	A	-	-
		O174:H21	<i>vt2c</i>	C	-	-
Vacuno/54	100-999	O174:H21	<i>vt2c</i>	C	-	-
Vacuno/93	<10	O156:H25	<i>vt1a, eae-ζ1, E-hlyA, stcE</i>	D	-	-
Vacuno/134	<10	O113:H21	<i>vt2d, E-hlyA, subA</i>	C	-	-
Vacuno/147	>999	ONT:H16	<i>vt2a vt2g</i>	D	-	-
Vacuno/194	10-99	O26:H11	<i>vt1a, eae-β1, E-hlyA</i>	B	-	-
Cerdo/C19	10-99	O113:H4	<i>vt2d</i>	D	O25b:H4-B2-ST131 No BLEE Virotipo D4 10 genes de virulencia Nº de resistencias: 4	-
Cerdo/C120	<10	ONT:HNM	<i>vt2e</i>	*	-	-
Cerdo/C121	>999	O178:H19	<i>vt1a, vt2a vt2d, E-hlyA</i>	D	-	-
Cerdo/C143	10-99	O8:H9	<i>vt2e</i>	D	-	-
Cerdo/C145	100-999	O8:H9	<i>vt2e</i>	D	-	-
Cerdo/C149	100-999	O8:H9	<i>vt2e</i>	D	-	-
Cerdo/C156	<10	O8:H19	<i>vt2e</i>	C	O25b:H4-B2-ST131 No BLEE Virotipo D2 13 genes de virulencia Nº de resistencias: 2	-
Cerdo/C167	>999	O157:H7	<i>vt1a, vt2c, eae-γ1, E-hlyA, stcE</i>	A	-	-
Cerdo/C175	<10	O26:H11	<i>vt1a, eae-β1, E-hlyA</i>	B	O25b:H4-B2-ST131 NO BLEE Virotipo D-nt 15 genes de virulencia Nº de resistencias: 2	-
Cerdo/C188	<10	O166:H28	<i>vt1c, vt2b, E-hlyA</i>	D	-	-
Ave/P125	<10	ONT:HNM	<i>vt2e</i>	*	-	-
Ave/P159	10-99	O26:H11	<i>vt1a, eae-β1, E-hlyA</i>	B	-	O11:H51 CTX-M-9 3 genes de virulencia Nº de resistencias: 10
Lechuga/VH46	10-99	O146:H21	<i>vt1c, vt2b, E-hlyA</i>	D	-	-
Lechuga/VH218	<10	O145:H34	<i>vt2f, eae-α1</i>	D	-	-

En negrita: cepas con estatus ExPEC

*No se asignó seropatotipo a las cepas ONT:H8, ONT:H21 y ONT:HNM porque a pesar de han sido descritos en cepas de origen humano, no tenemos la certeza de que no presenten antígenos O y/o H diferentes.

Ninguna de las 200 muestras de carne picada de vacuno resultó positiva, simultáneamente, para el aislamiento de cepas de ECVT y cepas del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) o productoras de BLEE. Por el contrario, en 3 de las 200 muestras de carne picada de cerdo, se aislaron cepas ECVT (seropatotipos B, C y D) y cepas del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131).

Cabe destacar la muestra de carne de cerdo C175, de la que se aisló 1 cepa ECVT del serotipo altamente virulento O26:H11 y 1 cepa del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) portadora de 15 genes de virulencia. Curiosamente, la muestra de origen de ambas cepas (C175) presentaba un recuento inferior a 10 *E. coli* por gramo, lo que demuestra que recuentos microbiológicos bajos no garantizan en absoluto la inocuidad de los alimentos. Lo mismo ocurre con la muestra de carne de cerdo C156, con un recuento inferior a 10 *E. coli* por gramo, de la que se aisló una cepa ECVT del seropatotipo C y una cepa del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) portadora de 13 genes de virulencia, que además presentó una identidad >90% con una cepa de origen humano aislada de un hemocultivo (Figura 41); esta cepa O25b:H4-B2 (ST131), aislada de la muestra de cerdo, ha demostrado además ser altamente letal en el modelo murino de sepsis (10/10 ratones ensayados; datos no publicados), lo que confirma la virulencia de la misma. También destacar que en 1 de las 200 muestras de pechuga de pollo (P159) se aisló 1 cepa ECVT del serotipo altamente virulento O26:H11, y 1 cepa de *E. coli* del serotipo O11:H51 productora de CTX-M-9 que además presentaba resistencias asociadas frente a 10 antimicrobianos, incluidos aminoglucósidos, quinolonas fluoradas y trimetoprim-sulfametoxazol; es decir, en esta muestra de carne de ave confluía un repertorio de genes intestinales, extraintestinales y de resistencia.

Adicionalmente, evaluamos el factor estatus ExPEC por ser un indicador de patogenicidad. Encontramos que 61 muestras de 950 analizadas (6,4%) presentaban cepas que cumplían dicho estatus, siendo las 61 de origen cárnico (10,2% de las 600 muestras). Específicamente, por tipo de carne: 41 muestras de origen aviar (20,5%), 16 muestras de origen porcino (8%) y 4 muestras de origen vacuno (2%). Al correlacionar estas 61 muestras positivas para aislamientos de cepas ExPEC con la presencia de *E. coli* diarreagénicos, observamos que en 31 de las 41 muestras (75%) de pechugas de pollo se

aislaron también ECEPa; y que de las 16 muestras de carne de cerdo positivas al estatus ExPEC, en 3 (18,8%) se aislaron ECVT y en 2 (12,5%) cepas ECEPa (Figura 43).

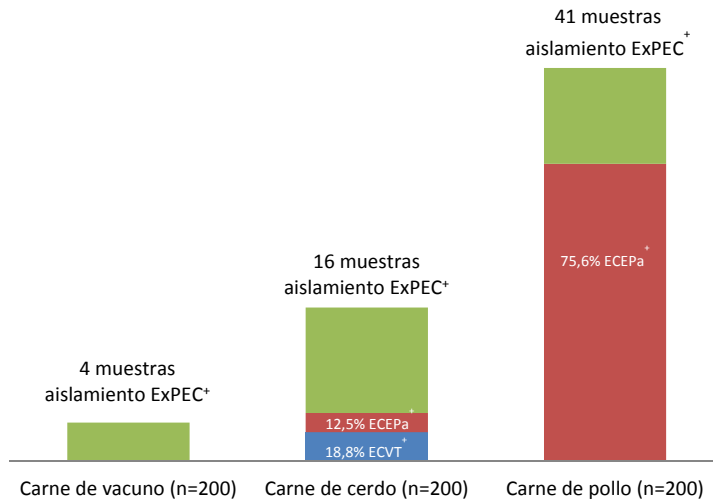


Figura 43. Correlación de las 61 cepas ExPEC con el aislamiento de cepas de *E. coli* diarreagénicos

El presente estudio es el primero a nivel mundial que analiza, de manera conjunta, la presencia de cepas de *E. coli* diarreagénicas, de cepas del grupo clonal O25b:H4-B2 (ST131) y de cepas productoras de BLEE en diferentes grupos de alimentos. Los resultados indican que los productos cárnicos puestos a la venta en la ciudad de Lugo, y principalmente la carne de ave, son portadores de cepas potencialmente patógenas para el hombre.

Concluimos, por tanto, que hemos identificado la coexistencia en un mismo alimento de cepas de *E. coli* pertenecientes a diferentes patotipos, portadoras de un variado repertorio de genes de virulencia y de resistencias, y con alta similitud con cepas de origen humano. Este hecho pone en evidencia el potencial riesgo de emergencia de nuevos patotipos de *E. coli* en alimentos, tal y como sucedió en el brote de Alemania, con posibilidades reales de transmisión al hombre.



CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Los niveles de contaminación por *E. coli* en los alimentos adquiridos en los establecimientos de la ciudad de Lugo son significativamente superiores en carnes que en productos vegetales, y significativamente superiores para la carne de pollo.
2. La detección de recuentos insatisfactorios (>500 ufc/g) en los productos cárnicos de los 3 orígenes (4% de las muestras de vacuno y el 3%, respectivamente, de las de carne de cerdo y ave analizadas) supone la presencia en los establecimientos de venta al consumidor de carnes que son rechazables según la legislación relativa a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Reglamento CE Nº 2073/2005, y posteriores modificaciones).
3. La calidad microbiológica de la carne de pollo envasada en atmósfera modificada analizada en este estudio resultó ser significativamente inferior a la de la carne fresca, lo que indica que la calidad microbiológica final en estos productos envasados está condicionada a la carga microbiológica inicial y a los sistemas adicionales de conservación, como es la temperatura.
4. Constatamos la presencia de cepas diarregénicas, específicamente de los patotipos ECVT y ECEPa, en carnes y productos agrícolas. Por las prevalencias obtenidas, se confirman la carne picada de vacuno y de cerdo como fuentes de transmisión de ECVT al hombre y, fundamentalmente la de ave, como transmisora de ECEPa.
5. Los recuentos bajos de *E. coli* por gramo no aseguran la no presencia de cepas diarregénicas. La mayoría de las muestras cárnicas y productos vegetales portadoras de algún patotipo de *E. coli* diarregénico presentaron recuentos aceptables (<100 ufc/g), de acuerdo con la legislación (Reglamento CE Nº 2073/2005, y posteriores modificaciones).
6. En los quesos curados de leche cruda de oveja, confirmamos que 4 meses de maduración no garantizan la ausencia de ECVT. Es crucial una buena calidad microbiológica de la leche y garantizar el periodo de maduración para minimizar el riesgo de presencia de este patógeno en el producto final.

8. Los alimentos cárnicos adquiridos en los establecimientos de la ciudad de Lugo son portadores de cepas ECVT de seropatotipos de significación clínica según la clasificación de Karmali (A, B, C o D). Concretamente, se han aislado cepas altamente virulentas del seropatotipo O26:H11-B en los tres tipos de carne analizadas y del seropatotipo O157:H7-A en carne de vacuno y cerdo.

9. Corroboramos el papel de la carne de vacuno como transmisora de cepas zoonóticas de ECVT del serotipo altamente virulento O157:H7. Identificamos 1 cepa verotoxigénica O157:H7 aislada de carne picada de vacuno con el mismo perfil de virulencia y alta similitud en su perfil de macrorrestricción que aislados clínicos humanos de diferente origen geográfico.

10. Los productos agrícolas son fuente potencial transmisora de cepas zoonóticas de ECVT del serotipo O146:H21, ampliamente distribuidas en nuestra área geográfica, y frecuentemente aisladas en pacientes del hospital de la ciudad de Lugo. Aislamos 1 cepa verotoxigénica O146:H21 de lechuga con el mismo perfil de virulencia y alta similitud en su perfil de macrorrestricción que una cepa de origen clínico humano. No obstante, los productos agrícolas raramente están contaminados por ECVT presentando recuentos de *E. coli* muy bajos.

11. La herramienta de PFGE es de gran utilidad a la hora de determinar la fuente de origen de las cepas aisladas en alimentos, así como en la detección de contaminaciones cruzadas. La presencia en carne de ave de la cepa del serotipo altamente virulento O26:H11, con idéntico perfil de virulencia y alta similitud que cepas de origen bovino y origen clínico humano, supone contaminación cruzada con carne de vacuno.

12. Los alimentos adquiridos en los establecimientos de la ciudad de Lugo, tanto cárnicos como productos agrícolas, son transmisores potenciales de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y de cepas del grupo clonal pandémico O25b:H4-B2 (ST131). Destaca por su especial riesgo la carne de ave, en la que se detecta un porcentaje significativamente superior de cepas con estatus ExPEC. Además, sorprende el elevado número de cepas productoras de BLEE aisladas de aves que poseen el gen *eae*.

-
13. El predominio de los filogrupos A y B1 entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de alimentos parece indicar que los genes *bla*BLEE se encuentran asentados entre cepas comensales de *E. coli* de los animales de producción cárnica.
14. Los elevados niveles de corresponsión a otros antimicrobianos en las cepas BLEE aisladas de carnes sugieren la coselección de cepas BLEE a través de la aplicación de los mismos en medicina veterinaria. En concreto, los aminoglucósidos y las cefalosporinas de 3^a-4^a generación estarían contribuyendo a la diseminación de cepas CTX-M del grupo 1, y las quinolonas (incluidas las fluoradas) junto con el trimetoprim-sulfametoxazol a la diseminación de cepas CTX-M del grupo 9. Todos estos antimicrobianos estarían además facilitando la presencia de cepas SHV, concretamente del tipo SHV-12.
15. Demostramos el potencial zoonótico del grupo clonal O153:H10-A (ST10), prevalente en animales de producción y sus productos, e implicado en patología humana, portador de genes de virulencia diarreagénicos y de genes codificadores de BLEE. Este grupo clonal aparece altamente conservado a lo largo del tiempo, por lo que podría tratarse de un grupo clonal exitoso con importantes implicaciones para la salud pública.
16. De especial preocupación es la detección en alimentos del grupo clonal pandémico O25b:H4-B2 (ST131) con potencial zoonótico. Se evidencia el papel de la carne de ave y de cerdo en la transmisión de este grupo clonal; fundamentalmente (aunque no exclusivamente) la carne de cerdo como transmisora de cepas del virotipo D2 y D5, y la carne de pollo como transmisora de cepas del virotipo D4. No obstante, el subclón H30, que predomina entre los aislados clínicos humanos, no se ha detectado en ninguno de los alimentos muestreados.
17. Evidenciamos el potencial riesgo de emergencia de nuevos patotipos de *E. coli* altamente virulentos y multirresistentes en alimentos, tal y como sucedió en el brote de Alemania, con posibilidades reales de transmisión al hombre, en base a la coexistencia en un mismo alimento de cepas de *E. coli* pertenecientes a diferentes patotipos, portadoras de un variado repertorio de genes de virulencia y de resistencias, y con alta similitud con cepas de origen humano.
-



BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía general

Aarestrup, F. M., Hasman, H., Agersø, Y., Jensen, L. B., Harksen, S., & Svensmark, B. 2006. First description of blaCTX-M-1-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6): 1258-1259.

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1): 121-129.

Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Machado, A. M. O., Elias, W. P., Hernandez, R. T. & Gomes, T. A. 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(3): 397-406.

Ackers, M. L., Mahon, B. E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Rice, D. H., Barrett, T. J., Hutwagner, L., Griffin, P. M., & Slutsker, L. 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *Journal of Infectious Diseases*, 177(6): 1588-1593.

Adachi, J. A., Jiang, Z. D., Mathewson, J. J., Verenkar, M. P., Thompson, S., Martínez-Sandoval, F., Steffen, R., Ericsson, C. D., & DuPont, H. L. 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clinical Infectious Diseases*, 32(12): 1706-1709.

Adachi, J. A., Mathewson, J. J., Jiang, Z. D., Ericsson, C. D., & DuPont, H. L. 2002. Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Annals of Internal Medicine*, 136(12): 884-887.

Adu-Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Goncalves, A. G., Trabulsi, L. R., Douce, G., Knutton, S., & Dougan, G. 1998. Detection of intimin alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3): 662-668.

AESAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. 2012. Memoria anual del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI) Año 2011., Expedientes destacados en el año 2011. Notificaciones de alerta de pepinos españoles por presencia de *E. coli* enterohemorrágico.

AECOSAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. 2012. AESAN-2012-007. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VTEC/STEC/EHEC). *Revista del Comité Científico* 16: 71-100.

Afset, J. E., Bergh, K., & Bevanger, L. 2003. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, 52(11): 1015-1019.

Afset, J. E., Bevanger, L., Romundstad, P., & Bergh, K. 2004. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, 53(11): 1137-1144.

Afset, J. E., Anderssen, E., Bruant, G., Harel, J., Wieler, L., & Bergh, K. 2008. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7): 2280-2290.

Ahmed, A. M., Kawamoto, H., Inouye, K., Hashiwata, Y., Sakaki, M., Seno, M., & Shimamoto, T. 2005. Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 causing a family outbreak in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 54(9): 867-872.

Ahmed, A. M., & Shimamoto, T. 2015. Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 193: 68-73.

Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D. L., Silveira, W. D., & de Castro, A. F. P. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3): 297-306.

Aktan, I., Sprigings, K. A., La Ragione, R. M., Faulkner, L. M., Paiba, G. A., & Woodward, M. J. 2004. Characterisation of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. *Veterinary Microbiology*, 102(1-2): 43-53.

Alexander, T. 1994. Neonatal diarrhoea in pigs. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Gyles, C.L. (ed). CAB international: Wallingford, United Kingdom, pp. 151-191.

Allison, H. E. 2007. Stx-phages: drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiology*, 2(2): 165-174.

Alonso, S., Gutierrez, A. M., Blanco, M., Blanco, J. E., Dahbi, G., Ferreiro, M. T., López, C., Alberghini, L., Albonetti, S., Echeita, A., Trevisani, M., & Blanco, J. 2007. Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *International Microbiology: Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 10(2): 109-116.

Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C. P., & Ray, B. 1999. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9): 4248-4251.

- Amaral, M. M., Sacerdoti, F., Jancic, C., Repetto, H. A., Paton, A. W., Paton, J. C., & Ibarra, C. 2013. Action of shiga toxin type-2 and subtilase cytotoxin on human microvascular endothelial cells. *Public Library Of Science one*, 8(7): 70431.
- Ambler, R. P. 1980. The Structure of β -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289(1036): 321-331.
- Andrade, A., Giron, J. A., Amhaz, J. M. K., Trabulsi, L. R., & Martínez, M. B. 2002. Expression and characterization of flagella in nonmotile enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from diarrhea cases. *Infection and Immunity*, 70(10): 5882-5886.
- Andreoli, S. P., Trachtman, H., Acheson, D. W. K., Siegler, R. L., & Obrigg, T. G. 2002. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy Proceedings of the American Society of Pediatric Nephrology Educational Symposium, May 2000, Boston, Massachusetts, USA. *Pediatric Nephrology*, 17(4): 293-298.
- Anónimo. 1997. *Escherichia coli* O157 outbreak in Lincolnshire. Communicable disease report. *CDR weekly*, 7(12): 101-101.
- Anónimo. 2001. Brot de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 en diferents escoles de Catalunya. *Boletín Epidemiológico de Cataluña*, 22: 59-64.
- Araujo, J. M., Tabarelli, G. F., Aranda, K. R., Fabbriotti, S. H., Fagundes-Neto, U., Mendes, C. M., & Scaletsky, I. C. 2007. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10): 3396-3399.
- Arias, M. L., Monge-Rojas, R., Chaves, C., & Antillón, F. 2001. Effect of storage temperatures on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in foods from a neotropical environment. *Revista de Biología Tropical*, 49(2): 517-524.
- Armstrong, G. L., Hollingsworth, J., & Morris, J. G. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews*, 18(1): 29-51.
- Auvray, F., Lecureuil, C., Dilasser, F., Tache, J., & Derzelle, S. 2009. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5): 554-559.
- Avery, S. M., Liebana, E., Hutchison, M. L., & Buncic, S. 2004. Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates associated with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meats and humans. *International Journal of Food Microbiology*, 92(2): 161-169.
- Aymerich, T., Picouet, P. A., & Monfort, J. M. 2008. Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78(1): 114-129.
- Awadallah, M., Ahmed, H., Merwad, A. 2014. Prevalence of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Enterotoxigenic Staphylococci in Ready-to eat Meat Products, Handlers and Consumers in Cairo, Egypt. *Global Veterinaria*. 12(5):692-699.
- Bae, W. K., Lee, Y. K., Cho, M. S., Ma, S. K., Kim, S. W., Kim, N. H., & Choi, K. C. 2006. A case of hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4. *Yonsei Medical Journal*, 47(3): 437-439.
- Bai, X., Wang, H., Xin, Y., Wei, R., Tang, X., Zhao, A., Sun, H., Zhang, W., Wang, Y., Xu, Y., Zhang, Z., Li, Q., Xu, J., & Xiong, Y. 2015. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. *International Journal of Food Microbiology*, 200: 31-38.
- Banatvala, N., Debeukelaer, M. M., Griffin, P. M., Barrett, T. J., Greene, K. D., Green, J. H., & Wells, J. G. 1996. Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O111 and associated hemolytic-uremic syndrome: A family outbreak. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 15(11): 1008-1011.
- Barrett, T. J., Kaper, J. B., Jerse, A. E., & Wachsmuth, I. K. 1992. Virulence factors in Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *Journal of Infectious Diseases*, 165(5): 979-980.
- Bauer, R. J., Zhang, L., Foxman, B., Siitonen, A., Jantunen, M. E., Saxen, H., & Marrs, C. F. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection—usp, iha, and iroNE. *Journal of Infectious Diseases*, 185(10): 1521-1524.
- Beaudry, M., Zhu, C., Fairbrother, J. M., & Harel, J. 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(1): 144-148.
- Bélanger, S. D., Boissinot, M., Ménard, C., Picard, F. J., & Bergeron, M. G. 2002. Rapid detection of Shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4): 1436-1440.
- Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., & Dozois, C. M. 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62(1): 1-10.
- Bell, B. P., Goldoft, M., Griffin, P. M., Davis, M. A., Gordon, D. C., Tarr, P. I., Bartleson, C. A., Lewis, J. H., Barrett, T. J., Wells, J. G., Baron, R., & Kobayashi, J. 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli*-O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic-uremic-syndrome from hamburgers -The Washington experience. *JAMA-Journal of the American Medical Association*, 272(17): 1349-1353.
- Benjamin, M. M. & Datta, A. R. 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4): 1669-1672.

- Benkerroum, N., Bouhlal, Y., El Attar, A., & Marhaben, A. 2004. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in selected dairy and meat products marketed in the city of Rabat, Morocco. *Journal of Food Protection*, 67(6): 1234-1237.
- Berg, J. T., McAllister, S., Bach, R., Stiborn, D., Hancock & LeJeune, J. 2004. *Escherichia coli* O157:H7 excretion by commercial feedlot cattle fed either barley- or corn-based finishing diets. *Journal of Food Protection*, 67: 666-671.
- Bergeron, C.R., Prussing, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dutil, L., Reid-Smith, R.J., Zhanel, G.G., Manges, A.R. 2012. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerging Infectious Disease*, 18, 415-421.
- Besser, R. E., Griffin, P. M., & Slutsker, L. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: An Emerging Infectious Disease 1. *Annual Review of Medicine*, 50(1): 355-367.
- Bettelheim, K. A. 2000. Role of non-O157 VTEC. *Journal of Applied Microbiology*, 88(51): 385-505.
- Bettelheim, K. A., & Beutin, L. 2003. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *Journal of Applied Microbiology*, 95(2): 205-217.
- Bettelheim, K. A. 2007. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(1): 67-87.
- Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, 59(2): 204-216.
- Beuchat, L. R. & Ryu, J. H. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4): 459-465.
- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., & Scheutz, F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in 7 different species of healthy domestic-animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(9): 2483-2488.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., & Karch, H. 1995. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic-animals of different species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3): 631-635.
- Beutin, L., Zimmermann, S., & Gleier, K. 1996. Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(11): 2812-2814.
- Beutin, L., Zimmermann, S., & Gleier, K. 2002. Evaluation of the VTEC-Screen "Seiken" test for detection of different types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC) in human stool samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42(1): 1-8.
- Beutin, L., Marches, O., Bettelheim, K. A., Gleier, K., Zimmermann, S., Schmidt, H., & Oswald, E. 2003. HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. *Infection and Immunity*, 71(7): 3995-4002.
- Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S., & Gleier, K. 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3): 1099-1108.
- Beutin, L., Kaulfuss, S., Herold, S., Oswald, E., & Schmidt, H. 2005. Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4): 1552-1563.
- Beutin, L. 2006. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(7): 299-305.
- Beutin, L., Steinrück, H., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Hultsch, G., & Appel, B. 2007. Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *Journal of Applied Microbiology*, 102(3): 630-639.
- Beutin, L., Krüger, U., Krause, G., Miko, A., Martin, A., & Strauch, E. 2008. Evaluation of major types of Shiga toxin 2E-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15): 4806-4816.
- Beutin, L., Jahn, S., & Fach, P. 2009. Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4): 1122-1132.
- Beutin, P. D. L., Martin, A., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Pries, K., Albrecht, N., Miko, A., & Jahn, S. 2010. Ergebnisse, Schlussfolgerungen und Empfehlungen aus zwei Ringversuchen zum Nachweis und zur Isolierung von Shiga (Vero) Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) aus Hackfleischproben. *Journal Für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(1): 21-34.
- Beutin, L., & Fach, P. 2014. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonhuman sources and strain typing. *Microbiology Spectrum*, 2(4): EHEC-0001.
- Bidet, P., Mahjoub-Messai, F., Blanco, J., Blanco, J., Dehem, M., Aujard, Y., Bingen, E., & Bonacorsi, S. 2007. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes

- associated with infant urosepsis and/or meningitis. *Journal of Infectious Diseases*, 196(2): 297-303.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Koeck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., & Karch, H. 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infectious Diseases*, 11(9): 671-676.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Bletz, S., Zhang, W., Köck, R., Kossow, A., Prager, R., Frth, A., Orth-Höller, D., Marejková, M., Morabito, S., Caprioli, A., Piérard, D., Smith, G., Jenkins, C., Curová, K., & Karch, H. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H7: a new virulent clone emerges in Europe. *Clinical Infectious Diseases*, 56(10): 1373-1381.
- Blaak H., van Hoek A.H., Hamidjaja R.A., van der Plaats R.Q., Kerkhof-de Heer L., de Roda Husman A.M., Schets F.M. 2015. Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. *PLoS One*. 2015 10(8):e0135402.
- Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, E., Navarro, F., Cortés, P., & Llagostera, M. 2006. ESBL-and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Veterinary Microbiology*, 118(3-4): 299-304.
- Blanco, J., Alonso, M. P., Blanco, M., & González, E. A. 1991. Pathogenetic mechanisms of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 9(10): 640-651.
- Blanco J., Blanco M., Alonso, M. P., Garabal, J. I., Blanco, J. E., & González, E. A. 1992. Factores de virulencia de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. Lugo, Monografía nº 170, Servicio de Publicaciones de Intercambio Científico. Universidade de Santiago de Compostela.
- Blanco, J. & Blanco, M. 1993. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotóxicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Lugo (Galicia) España.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J., Alonso, M. P., & Escribano, A. 1993. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por *Escherichia coli* enterohemorrágicos productores de verotoxinas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 11: 324-334.
- Blanco, J., Blanco, M., Escribano, A., Blanco, J., Alonso, M., Marín, J., & Hernández, R. 1995. *Escherichia coli* verotoxigénicos y el síndrome urémico hemolítico. Aspectos clínicos y microbiológicos. *Anales Españoles de Pediatría*, 42: 95-106.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Alonso, M. P., González, E. A., & Bernárdez, M. I. 2001. Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In: G. Duffy & P. Garvey & A. McDowell (Eds.), *Verocytotoxigenic E. coli*. Food and Nutrition Press: EEUU, pp. 113-148.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Alonso, M., González, E., & Bernárdez, M. 2002. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. En: *Manual de Microbiología Veterinaria*. Eds. Vadillo S., Píriz S & Mateos E. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 301-325.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., González, E. A., Bernárdez, M. I., Alonso, M. P., Coira, A., Rodríguez, A., & Rey, J. 2003. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Experimental Biology and Medicine*, 228(4): 345-351.
- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., López, C., Blanco, M., Dahbi, G., Herrera, A., Blanco, J. E., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Chaves, F., Orellana, M. A., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Prats, G., Larrosa, M. N., González-López, J. J., López-Cerero, L., Rodríguez-Baño, J., & Pascual, A. 2011. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal group O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9): 2011-2021.
- Blanco, J. 2012. Stx2a-producing enteroagregative *Escherichia coli* O104:H4-ST678. Microbiological diagnostic already, for this and other STEC/VTEC serotypes! *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(2): 84-89.
- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., López, C., Blanco, M., Dahbi, G., Herrera, A., Marzoa, J., Fernández, V., de la Cruz, F., Martínez-Martínez, L., Alonso, M. P., Nicolas-Chanoine, M-H., Johnson, J. R., Johnston, B., López-Cerero, L., Pascual, A., & Rodríguez-Baño, J. 2013. Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10): 3358-3367.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Balaguer, L., Mouriño, M., Juárez, A., & Jansen, W. H. 1996a. O serogroups, biotypes, and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12): 3101-3107.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Río, M., Santisima Trinidad, B., Prado, C., Fernández, L., & Blanco, J. 1996b. *Escherichia coli* necrotóxicos (ECNT) CNF1⁺ y CNF2⁺ como indicadores de la contaminación microbiana de los alimentos. *Alimentaria* 275: 79-85.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Molinero, M. E., Peiró, E., Mora, A., & Blanco, J. 1996c. Brote de gastroenteritis asociado con un *Escherichia coli* verotoxigénico (ECVT) O111:H⁻VT1⁺eae⁺. *Alimentaria*, 275: 110-113.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Prado, C., Río, M., Fernández, L., Fernández, M. J., Sainz, V., & Blanco, J. 1996d. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation. *Microbiología SEM*, 12: 385-394.

- Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Mora, A., Dahbi, G., Coira, M. A., & Blanco, J. 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1): 311-319.
- Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J. E., & Ramos, J. 1993. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *American Journal of Veterinary Research*, 54(9): 1446-1451.
- Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J. E., González, E. A., Gomes, T. A. T., Zerbini, L. F., Yano, T., & Decastro, A. F. P. 1994. Genes-coding for Shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging to different O-K-H serotypes. *Veterinary Microbiology*, 42(2-3): 105-110.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., & Blanco, J. 1996. Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *European Journal of Epidemiology*, 12(2): 191-198.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Mora, A., Balsalobre, C., Munoa, F., Juárez, A., & Blanco, J. 1997a. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Research in Microbiology*, 148(9): 745-755.
- Blanco, M., Blanco, J. E., González, E. A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T., Zerbini, L. F., Yano, T., de Castro, A., & Blanco, J. 1997b. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11): 2958-2963.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Blaaguer, L., Blanco, J. 1997c. *Escherichia coli* enteropatógenos (ECEP) para conejos: mecanismos de patogénesis, serobiotipos, quimioterapia y vacunación. *Medicina Veterinaria*, 14: 133-144.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M. P., González, E. A., Bernárdez, M. I., & Blanco, J. 2003a. Typing of *eae*, *tir*, *esp A*, *esp B* and *esp D* genes of LEE pathogenicity island of VTEC and EPEC: intimin types. 5th International Symposium on "Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* infections". Edinburgh. Final programme and Book of Abstracts, p47 abstract, 114.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Dahbi, G., González, E. A., Bernárdez, M. I., & Blanco, J. 2003b. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4): 1351-1356.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., de Carvalho, V. M., Onuma, D. L., & Pestana de Castro, A. F. P. 2004a. Typing of intimin (*eae*) genes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains from monkeys. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3): 1382-1383.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M. P., González, E. A., Bernárdez, M. I., & Blanco, J. 2004b. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2): 645-651.
- Blanco, M., Padola, N. L., Kruger, A., Sanz, M. E., Blanco, J. E., González, E. A., Dahbi, G., Mora, A., Bernardez, M. I., Etcheverría, A. I., Arroyo, G. H., Lucchesi, P. M. A., Parma, A. E., & Blanco, J. 2004c. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology*, 7(4): 269-276.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Pita, J. M., da Silva, D., Mora, A., Dahbi, G., Justel, P., Alonso, M. P., Coira, M. A., Echeita, M. A., & Blanco, J. 2004d. Prevalencia, serotipos genes de virulencia, tipos de intiminas, perfiles de PFGE y fagotipos de *Escherichia coli* verotoxigénicos en coproductivos (2003). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(1):185.
- Blanco, M., Schumacher, S., Tasara, T., Zweifel, C., Blanco, J. E., Dahbi, G., Blanco, J., & Stephan, R. 2005. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-eta* 2). *BMC Microbiology*, 5(1):23.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Dahbi, G., Alonso, M. P., Mora, A., Coira, M. A., Madrid, C., Juárez, A., Bernárdez, M. I., González, E. A., & Blanco, J. 2006a. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *International Microbiology*, 9(2): 103-110.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Dahbi, G., Mora, A., Alonso, M. P., Varela, G., Gadea, M. P., Schelotto, F., González, E. A., & Blanco, J. 2006b. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (μ B and ξ R/ β 2B). *Journal of Medical Microbiology*, 55(9): 1165-1174.
- Blanco, M., Alonso, M. P., Nicolas-Chanoine, M. H., Dahbi, G., Mora, A., Blanco, J. E., López, C., Cortés, P., Llagostera, M., Leflon-Guibout, V., Puentes, B., Mamani, R., Herrera, A., Amparo Coira, M., García-Garrote, F., Maria Pita, J., & Blanco, J. 2009. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(6): 1135-1141.
- Boehme, S., Werner, G., Klare, I., Reissbrodt, R., Witte, W. 2004. Occurrence of antibiotic-resistant Enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition and Food Research*. 48, 522-531.

- Bogossian, G., Sammons, L. E., Morris, P. J., O'Neil, J. P., Heitkamp, M. A., & Weber, D. B. 1996. Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4114-4120.
- Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., & Barrios, P. R. 2011. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, 52(10): 1095-1100.
- Boisen, N., Scheutz, F., Rasko, D. A., Redman, J. C., Persson, S., Simon, J., Kotloff, K. L., Levine, M. M., Sow, S., Tamboura, B., Toure, A., Malle, D., Panchanlingam, S., Krogfelt, K. A., & Nataro, J. P. 2012. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *Journal of Infectious Diseases*, 205(3): 431-444.
- Bolduc, D., Srour, L. F., Sweet, L., Neatby, A., Galanis, E., Isaacs, S., & Lim, G. 2004. Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002. *Canada communicable disease report-Releve des maladies transmissibles au Canada*, 30(9): 81-88.
- Bonardi, S., Brindani, F., Pizzin, G., Lucidi, L., D'Incau, M., Liebana, E., & Morabito, S. 2003. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2): 101-110.
- Borie, C., Monreal, Z., Guerrero, P., Sánchez, M. L., Martínez, J., Arellano, C., & Prado, V. 1997. Prevalence and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated from healthy cattle and pigs slaughtered in Santiago, Chile. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 29(2): 205-212.
- Borjesson, S., Egervarn, M., Finn, M., Tillander, I., Wiberg, C., Englund, S. 2011. High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* in chicken meat imported into Sweden. *Clinical Microbiology and Infection*, 17:54. O353.
- Bosilevac, J. M., Nou, X., Barkocy-Gallagher, G. A., Arthur, T. M., & Koohmaraie, M. 2006. Treatments using hot water instead of lactic acid reduce levels of aerobic bacteria and Enterobacteriaceae and reduce the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on preeviceration beef carcasses. *Journal of Food Protection*, 69(8): 1808-1813.
- Bosilevac, J. M., Guerini, M. N., Brichta-Harhay, D. M., Arthur, T. M., & Koohmaraie, M. 2007. Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef. *Journal of Food Protection*, 70(2): 440-449.
- Bosilevac, J. M. & Koohmaraie, M. 2011. Prevalence and characterization of non-o157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6): 2103-2112.
- Bosilevac, J. M. & Koohmaraie, M. 2012. Predicting the presence of non-o157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef by using molecular tests for Shiga toxins, intimin, and o serogroups. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19): 7152-7155.
- Brandt, J. R., Fouser, L. S., Watkins, S. L., Zelikovic, I., Tarr, P. I., Nazarstewart, V., & Avner, E. D. 1994. *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. *Journal of Pediatrics*, 125(4): 519-526.
- Brettar, I., & Höfle, M. G. 1992. Influence of ecosystematic factors on survival of *Escherichia coli* after large-scale release into lake water mesocosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7): 2201-2210.
- Breuer, T., Benkel, D. H., Shapiro, R. L., Hall, W. N., Winnett, M. M., Linn, M. J., Neimann, J., Barrett, T. J., Dietrich, S., Downes, F. P., Toney, D. M., Pearson, J. L., Rolka, H., Slutsker, L., Griffin, P. M., & Investigation, T. 2001. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerging Infectious Diseases*, 7(6): 977-982.
- Brooks, H. J., Mollison, B. D., Bettelheim, K. A., Matejka, Paterson, K. A., & Ward, V. K. 2001. Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. *Letters in Applied Microbiology*, 32: 118-122.
- Brooks, J. T., Sowers, E. G., Wells, J. G., Greene, K. D., Griffin, P. M., Hoekstra, R. M., & Strockbine, N. A. 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *Journal of Infectious Diseases*, 192(8): 1422-1429.
- Brusa, V., Aliverti, V., Aliverti, F., Ortega, E. E., de la Torre, J. H., Linares, L. H., Sanz, M. E., Etcheverría, A. I., Padola, N. L., Galli, L., Peral García, P., Copes, J., & Leotta, G. A. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(171): 1-6.
- Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M. M., Renschmidt, C., Wilking, H., Deleré, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., Ehlers, J., Ethelberg, S., Faber, M., Frank, C., Fricke, G., Greiner, M., Höhle, M., Ivarsson, S., Jark, U., Kirchner, M., Koch, J., Krause, G., Lubber, P., Rosner, B., Stark, K., & Kühne, M. 2011. German outbreak of *Escherichia coli* O104: H4 associated with sprouts. *New England Journal of Medicine*, 365(19): 1763-1770.
- Buck, J. W., Walcott, R. R., & Beuchat, L. R. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant Health Progress*, 10: 1094.
- Burgos, Y., & Beutin, L. 2012. Evaluation of an Immuno-Chromatographic Detection System for Shiga Toxins and the *E. coli* O157 Antigen. INTECH Open Access Publisher, 29-40.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its

- correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 39: 1211-1233.
- Bustamante, A. V., Sanso, A. M., Lucchesi, P. M. A., & Parma, A. E. 2011. Multiplex PCR assay for the detection of five putative virulence genes encoded in verotoxigenic *Escherichia coli* plasmids. *Current Microbiology*, 62(5): 1411-1415.
- Buvens, G., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., Lauwers, S., & Piérard, D. 2010. Antimicrobial resistance testing of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and first description of TEM-52 extended-spectrum β -lactamase in serogroup O26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11): 4907-4909.
- Buvens, G., De Gheldre, Y., Dediste, A., de Moreau, A. I., Mascart, G., Simon, A., Allemeersch, D., Scheutz, F., Lauwers, S., & Piérard, D. 2012. Incidence and virulence determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections in the Brussels-Capital Region, Belgium, in 2008-2010. *Journal of Clinical Microbiology*, 50: 1336-1345.
- Byrne, L., Jenkins, C., Lauwers, N., Elson, R., & Adak, G. K. 2015. The epidemiology, microbiology and clinical impact of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in England, 2009-2012. *Epidemiology and Infection*, 29: 1-13.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27: 44-52.
- Cantón, R. & Coque, T. M. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5): 466-475.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., & Coque, T. M. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(s1): 144-153.
- Caprioli, A., & Tozzi, A. E. 1998. Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. In: Kaper JB, O'Brien AD. Eds. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press: Washington. D.C, pp. 38-48.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., & Oswald, E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, 36(3): 289-311.
- CAR/PL, Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia. 2006. Plan de Acción para el Mediterráneo. Prevención de la contaminación en la industria cárnica en la región mediterránea.
- Carmo, L. P., Nielsen, L. R., da Costa, P. M., & Alban, L. 2014. Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in meat in Denmark. *Infection Ecology & Epidemiology*, 4.
- Caro, I., & García-Armesto, M. 2007. Occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 116(3): 410-413.
- Carroll, A.M., Gibson, A., & McNamara, E. B. 2005. Laboratory based surveillance of human verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in the Republic of Ireland, 2002-2004. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 1163-1169.
- Carter, A. O., Borczyk, A. A., Carlson, J. A. K., Harvey, B., Hockin, J. C., Karmali, M. A., Krishnan, C., Korn, D. A., & Lior, H. 1987. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated hemorrhagic colitis in a nursing-home. *New England Journal of Medicine*, 317(24): 1496-1500.
- Carvalho, V. M., Gyles, C. L., Ziebell, K., Ribeiro, M. A., Catão-Dias, J. L., Sinhorini, I. L., Otman, J., Keller, R., Trabulsi, L. R., & Pestana de Castro, A. F. 2003. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3): 1225-1234.
- Casey, T. A., Nagy, B., & Moon, H. W. 1992. Pathogenicity of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* that do not express K88, K99, F41, or 987P adhesins. *American Journal of Veterinary Research*, 53(9): 1488-1492.
- Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F., & Foster, J. W. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(11): 3525-3535.
- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., López-Hernández, D., Gómez-Aldapa, C. A., & Estrada-García, T. 2012. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 156(2): 176-180.
- Catford, A., Kouamé, V., Martínez-Perez, A., Gill, A., Buenaventura, E., Couture, H., & Farber, J. M. 2014. Risk profile on non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli* in produce, beef, milk and dairy products in Canada. *International Food Risk Analysis Journal*, 4: 21.
- Cergole-Novella, M. C., Pignatari, A. C. C., Castanheira, M., & Guth, B. E. C. 2011. Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. *Research in Microbiology*, 162(2): 117-123.
- Cernicchiaro, N., Renter, D. G., Cull, C. A., Paddock, Z. D., Shi, X., & Nagaraja, T. G. 2014. Fecal Shedding of Non-O157 Serogroups of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Feedlot Cattle Vaccinated with an *Escherichia coli* O157:H7 SRP Vaccine or Fed a Lactobacillus-Based Direct-Fed Microbial. *Journal of Food Protection*, 77(5): 732-737.
- Chapman, P. A., Wright, D. J., & Siddons, C. A. 1994. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing

- Escherichia coli* O157 from bovine feces. Journal of Medical Microbiology, 40(6): 424-427.
- Charatan, F. 1999. New York outbreak of E coli poisoning affects 1000 and kills two. British Medical Journal, 319(7214): 873-873.
- Chattaway, M. A., Dallman, T., Okeke, I. N., & Wain, J. 2011. Enteroaggregative *E. coli* O104 from an outbreak of HUS in Germany 2011, could it happen again?. The Journal of Infection in Developing Countries, 5(06): 425-436.
- Chattaway, M. A., Harris, R., Jenkins, C., Tam, C., Coia, J. E., Gray, J., Iturriza-Gomara, M., & Wain, J. 2013. Investigating the link between the presence of enteroaggregative *Escherichia coli* and infectious intestinal disease in the United Kingdom, 1993 to 1996 and 2008 to 2009. Euro Surveillance, 18(37): 20582
- Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. Infection, Genetics and Evolution, 12(2): 214-226.
- Chen, X., Gao, S., Jiao, X., & Liu, X. F. 2004. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. Veterinary Microbiology, 103(1): 13-20.
- Chinen, I., Tanaro, J. D., Miliwebsky, E., Lound, L. H., Chillemi, G., Ledri, S., Baschkier, A., Scarpin, M., Manfredi, E., & Rivas, M. 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. Journal of Food Protection, 64(9): 1346-1351.
- Chinen, I., Otero, J. L., Miliwebsky, E. S., Roldan, M. L., Baschkier, A., Chillemi, G. M., Noboli, C., Frizzo, L., & Rivas, M. 2003. Isolation and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from calves in Argentina. Research in Veterinary Science, 74(3): 283-286.
- Chinen, I., Epsztejn, S., Melamed, C. L., Aguerre, L., Martínez Espinosa, E., Motter, M. M., Baschkier, A., Manfredi, E., Miliwebsky, E., & Rivas, M. 2009. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. International Journal of Food Microbiology, 132(2-3): 167-171.
- Chun, H. H., Kim, J. Y., Lee, B. D., Yu, D. J., & Song, K. B. 2010. Effect of UV-C irradiation on the inactivation of inoculated pathogens and quality of chicken breasts during storage. Food Control, 21(3): 276-280.
- Cid, D., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Marin, I., Sanz, R., Orden, J. A., Amils, R., & de la Fuente, R. 2001. Association between intimin (eae) and EspB gene subtypes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs and goat kids. Microbiology-SGM, 147: 2341-2353.
- Cirone, K., Huberman, Y., Morsella, C., Méndez, L., Jorge, M., & Paolicchi, F. 2013. Growth of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Enteritidis during Preparation and Storage of Yogurt. ISRN Microbiology, 2013: 7.
- Clavero, M. R. S., Beuchat, L. R., & Doyle, M. P. 1998. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from ground beef and bovine feces, and suitability of media for enumeration. Journal of Food Protection, 61(3): 285-289.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Applied and Environmental Microbiology, 66(10): 4555-4558.
- Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., Branger, C., Denamur, E., & Arlet, G. 2008. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61(5): 1024-1028.
- Cohen, M. B., Nataro, J. P., Bernstein, D. I., Hawkins, J., Roberts, N., & Staat, M. A. 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: A prospective controlled study. Journal of Pediatrics, 146(1): 54-61.
- Coira A. 2008. β-Lactamasas de espectro ampliado: Estudio comparativo del período 1989-1993 con la situación actual. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Colomer-Lluch, M., Mora, A., López, C., Mamani, R., Dahbi, G., Marzoa, J., Herrera, A., Viso, S., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Jofre, J., Muniesa, M., & Blanco, J. 2013. Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O25b:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68(4): 758-765.
- Comery, R., Thanabalasuriar, A., Garneau, P., Portt, A., Boerlin, P., Reid-Smith, R. J., Harel, J., Manges, A. R., & Gruenheid, S. 2013. Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in canadian food animals at slaughter and in retail meats. Applied and Environmental Microbiology, 79(12): 3892-3896.
- Como-Sabetti, K., Reagan, S., Allaire, S., Parrott, K., Simonds, C., Hrabowy, S., Ritter, B., et al., Hall, W., Altamirano, J., & Martin, R. 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, June-July 1997. Morbidity and Mortality Weekly Report, 46: 741-744.
- Cookson, A. L., Taylor, S. C. S., & Attwood, G. T. 2006a. The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. New Zealand Veterinary Journal, 54(1): 28-33.
- Cookson, A. L., Taylor, S. C. S., Bennett, J., Thomson-Carter, F., & Attwood, G. T. 2006b. Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. New Zealand Veterinary Journal, 54(2): 78-84.
- Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Dhahi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A.,

- Sánchez, A., Corrales, J. C., & Orden, J. A. 2005. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Veterinary Microbiology*, 110(1-2): 67-76.
- Cortés, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, M., López, C., Andreu, A., Navarro, F., Alonso, M. P., Bou, G., Blanco, J., & Llagostera, M. 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9): 2799-2805.
- Cowden, J. M., Ahmed, S., Donaghy, M., & Riley, A. 2001. Epidemiological investigation of the Central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiology and Infection*, 126(3): 335-341.
- Cox, E., Melkebeek, V., Devriendt, B., Goddeeris, B. M., & Vanrompay, D. 2014. In: Morabito, S. (ed), Vaccines against enteric *E. coli* infections in animals. *Pathogenic Escherichia coli: molecular and cellular microbiology*, Caister Academic Press, pp. 255-270.
- Cravioto, A., Vázquez, V., Soria, A., Navarro, A., & Ortiz, M. 1988. Production of Shiga-1-type (SLT) cytotoxin in strains of *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in a rural community. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 45(4): 206-210.
- Cray, W. C., Casey, T. A., Bosworth, B. T., & Rasmussen, M. A. 1998. Effect of Dietary Stress on Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5): 1975-1979.
- Crim, S. M., Iwamoto, M., Huang, J. Y., Griffin, P. M., Gilliss, D., Cronquist, A. B., Cartter, M., Tobin-D'Angelo, M., Blythe, D., Smith, K., Lathrop, S., Zansky, S., Cieslak, P. R., Dunn, J., Holt, K. G., Lance, S., Tauxe, R., & Henao, O. L. 2014. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 2006-2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63(15): 328-332.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4): 822-880.
- Cutler, S. J., Fooks, A. R., & Van Der Poel, W. H. 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1): 1-7.
- Cutter, C. N., & Rivera-Betancourt, M. 2000. Interventions for the reduction of Salmonella Typhimurium DT 104 and non-O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* on beef surfaces. *Journal of Food Protection*, 63(10): 1326-1332.
- Dahbi, G., Mora, A., López, C., Alonso, M. P., Mamani, R., Marzoa, J., Coira, A., García-Garrote, F., Pita, J. M., Velasco, D., Herrera, A., Viso, S., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. 2013. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(4): 347-351.
- Dahbi, G., Mora, A., Mamani, R., López, C., Alonso, M. P., Marzoa, J., Blanco, M., Herrera, A., Viso, S., García-Garrote, F., Tchesnokova, V., Billig, M., de la Cruz, F., de Toro, M., González-López, J. J., Prats, G., Chaves, F., Martínez-Martínez, L., López-Cerezo, L., Denamur, E., Blanco, J. 2014. Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-ST13: comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8):1247-57.
- Dallman, T., Smith, G. P., O'Brien, B., Chattaway, M. A., Finlay, D., Grant, K. A., & Jenkins, C. 2012. Characterization of a verocytotoxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O111:H21 strain associated with a household outbreak in Northern Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12): 4116-4119.
- Dalmau, D., Navarro, F., Mirelis, B., Blanco, J., Garau, J., Prats, G. 1996. *Escherichia coli* bacteremia. Serotype O15:K52:H1 as a urinary pathogen. *Journal of Hospital Infection*, 34(3): 233-234.
- Davies, M., Engel, J., Griffin, D., Ginzl, D., Hopkins, R., Blackmore, C., et al. Center for Disease Control and Prevention. 2005. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 associated with petting zoos--North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 54(50): 1277-1280.
- Davis, M. 1994. Update multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers - Western United-States, 1992-1993 (Vol 269, pg 2194, 1993). *JAMA-Journal of the American Medical Association*, 271(5): 341-341.
- De Boer, E. & Heuvelink, A. E. 2001. Foods as vehicles of VTEC infection. In G. Duffy & P. Garvey & A. McDowell (Eds.), *Verocytotoxigenic E. coli*: 181-200. USA: Food and Nutrition Press.
- De Cueto, M. 2005. Diagnóstico microbiológico de la infección del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(Supl. 4): 9-14.
- Delannoy, S., Beutin, L., & Fach, P. 2012. Use of clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequence polymorphisms for specific detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of serotypes O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28, and O157:H7 by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12): 4035-4040.
- Derzelle, S., Grine, A., Madic, J., de Garam, C. P., Vingadassalon, N., Dilasser, F., Jamet, E., & Auvray, F. 2011. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in minced beef and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1): 44-51.
- Desmarchelier, P. M., Bilge, S. S., Fegan, N., Mills, L., Vary, J. C., & Tarr, P. I. 1998. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding

- O157 lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6): 1801-1804.
- Devaux, I., Varela-Santos, C., Payne-Hallström, L., Takkinen, J., Bogaardt, C., & Coulombier, D. 2015. Investigation of travel-related cases in a multinational outbreak: example of the Shiga-toxin producing *E. coli* outbreak in Germany, May-June 2011. *Epidemiology and Infection*, 1-7.
- Dhanji, H., Murphy, N. M., Doumith, M., Durmus, S., Lee, S. S., Hope, R., Woodford, N., & Livermore, D. M. 2010. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12): 2534-2537.
- Díaz, M. A., Hernández-Bello, J. R., Rodríguez-Baño, J., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Blanco, J., Pascual, A., & Spanish Grp Nosocomial, I. 2010. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: Second Nationwide Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8): 2840-2845.
- Dipineto, L., Santaniello, A., Fontanella, M., Lagos, K., Fioretti, A., & Menna, L. F. 2006. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Letters in Applied Microbiology*, 43(3): 293-295.
- Djordjevic, S. P., Ramachandran, V., Bettelheim, K. A., Vanselow, B. A., Holst, P., Bailey, G., & Hornitzky, M. A. 2004. Serotypes and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7): 3910-3917.
- Doi, Y., Paterson, D. L., Egea, P., Pascual, A., López-Cerero, L., Navarro, M. D., Adams-Haduch, J. M., Qureshi, Z. A., Sidjabat, H. E., & Rodríguez-Baño, J. 2010. Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1): 33-38.
- Domingue, G. J., Roberts, J. A., Laucirica, R., Ratner, M. H., Bell, D. P., Suarez, G. M., Kallenius, G., & Svenson, S. 1985. Pathogenic significance of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. *The Journal of Urology*, 133(6): 983-989.
- Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 60(10): 3953-3961.
- Donnenberg, M. S., Kaper, J. B., & Finlay, B. B. 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends in Microbiology*, 5(3): 109-114.
- Donnenberg, M. S., & Whittam, T. S. 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, 107(5): 539-548.
- Doorduyn, Y., de Jager, C. M., van der Zwaluw, W. K., Friesema, I. H. M., Heuvelink, A. E., de Boer, E., Wannet, W. J. B., & van Duynhoven, Y. T. H. P. 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September-October 2005. *Euro surveillance* : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles =European communicable disease bulletin, 11(7): 182-185.
- Doyle, M. E., Archer, J., Kaspar, C. W., & Weiss, R. 2006. Human illness caused by *E. coli* O157:H7 from food and non-food sources. FRI Briefings. Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, EEUU, pp. 37.
- Doyle, M. P., & Schoeni, J. L. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4): 855-856.
- Doyle, M. P. & Schoeni, J. L. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10): 2394-2396.
- Doyle M. P., Zhao T., Meng J., and Zhao S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. In: Doyle M.D., Beuchat L.R., & Montville T.J. (eds), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press: Washington, pp. 171-191.
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C., & Curtiss, R. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infection and Immunity*, 68(7): 4145-4154.
- Dupont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Sheahan, D. G., Labrec, E. H., & Kalas, J. P. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *New England Journal of Medicine*, 285(1): 1-9.
- Durso, L. M., Bono, J. L., & Keen, J. E. 2005. Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26:H11. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4941-4944.
- Dutta, S., Guin, S., Ghosh, S., Pazhani, G. P., Rajendran, K., Bhattacharya, M. K., Takeda, Y., Nair, G. B., & Ramamurthy, T. 2013. Trends in the prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *PLoS one*, 8(2).
- ECDC, European Centre for Disease Control and Prevention. 2013. Surveillance Report: Annual epidemiological report Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data Annual epidemiological report., Shiga toxin/verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) infection.
- ECDC/EFSA, European Centre for Disease Control and Prevention and European Food Safety Authority. 2011. Shiga toxin/verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104 infection. Technical report. European Centre for Disease Control and Prevention, Stockholm, Sweden, and Europe Food Safety Authority, Parma, Italy.
- Effler, P., Isaacson, M., Arntzen, L., Heenan, R., Canter, P., Barrett, T., Lee, L., Mambo, C., Levine, W., Zaidi, A., & Griffin, P. M. 2001. Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 812-819.

- EFSA, European Food Safety Authority. 2007. Scientific opinion of the panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *EFSA Journal*, 5(9): 1-61.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2009. Scientific report of EFSA: Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). *EFSA Journal*, 7(11): 11366-1409.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2011a. Urgent advice on the public health risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *EFSA Journal*, 9(6): 2274-2324.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2011b. Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4, 2011 Outbreaks in Germany and France. Parma, Italy: European Food Safety Authority.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2011c. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*; 9(8):2322.
- EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2011. Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9(3): 2090-2468.
- EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2012. The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3): 2597-3039.
- EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4): 3129-3379.
- EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. The European Union Summary on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12(2): 3547-3859.
- Egea, P., López-Cerero, L., Navarro, M. D., Rodríguez-Baño, J., & Pascual, A. 2011. Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in eggshells and ready-to-eat products. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(9): 1045-1047.
- Egea, P., López-Cerero, L., Torres, E., Gómez-Sánchez, M. C., Serrano, L., Navarro Sánchez-Ortiz, M. D., Rodríguez-Baño, J., & Pascual, A. 2012. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2): 69-73.
- Elder, R. O., Keen, J. E., Siragusa, G. R., Barkocy-Gallagher, G. A., Koochmaria, M., & Laegreid, W. W. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7): 2999-3003.
- Eribo, B., & Ashenafi, M. 2003. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in tomato and processed tomato products. *Food Research International*, 36(8): 823-830.
- Erickson, J. P., & Jenkins, P. 1991. Comparative *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* inactivation rates in four commercial mayonnaise products. *Journal of Food Protection*, 54(12): 913-916.
- Erickson, J. P., Stamer, J. W., Hayes, M., McKenna, D. N., & Vanalstine, L. A. 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. *Journal of Food Protection*, 58(10): 1059-1064.
- Escherich, T. 1885. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschritte der Medizin*, 3: 515-522.
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., & Denamur, E. 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6): 1085-1094.
- Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., & Vernozy-Rozand, C. 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection*, 134(01): 143-146.
- Estrada-García, T., & Navarro-García, F. 2012. Enterotoxigenic *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(3): 281-298.
- Etoh, Y., Murakami, K., Ichihara, S., Sera, N., Hamasaki, M., Takenaka, S., Horikawa, K., Kawano, K., Takeishi, T., Kuwana, Y., Inoue, A., Nagatsu, Y., Takahashi, M., & Ito, K. 2009. Isolation of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* (O115:HNM) from an adult symptomatic patient in Fukuoka Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Disease*, 62(4): 315-7.
- EU-RL, European Reference Laboratory for *E. coli*. 2013a. Identification and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) by Real Time PCR amplification of the main virulence genes and the genes associated with the serogroups mainly associated with severe human infections: 1-5: VTEC_Method_02_Rev 0. EU Reference Laboratory for *E. coli*. Department of Veterinary Public Health and Food Safety Unit of Foodborne Zoonoses. Istituto Superiore di Sanità.

- EU-RL, European Reference Laboratory for *E. coli*. 2013b. Identification of the subtypes of verocytotoxin encoding genes (VTX) of *Escherichia coli* by conventional PCR: 1-8: EU-RL VTEC_Method_006_Rev1. EU Reference Laboratory for *E. coli*. Department of Veterinary Public Health and Food Safety Unit of Foodborne Zoonoses. Istituto Superiore di Sanità.
- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P. A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L. H., & Guenther, S. 2010. Emergence of human pandemic O25: H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4): 651-660.
- Ewers, C., Stamm, I., Stolle, I., Guenther, S., Kopp, P. A., Fruth, A., Wieler, L. H., Scheufen, S., Bauerfeind, R., Bethe, A., & Prenger-Berninghoff, E. 2014. Detection of Shiga toxin-and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* O145: NM and Ont: NM from calves with diarrhoea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(7): 2005-2007.
- Ewing, W. H. 1986. The genus *Escherichia* in: Edward's and Ewing's (eds), *Identification of Enterobacteriaceae* (4th ed.), Elsevier: Nueva York, pp.93-134.
- Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. 2001. Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for the detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 809-818.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 1993. Estructura y funcionamiento de mataderos medianos en países en desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 92-5-303148-4.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2012. Prevención de la *E. coli* en los alimentos.
- FAO/OMS, Food and Agriculture Organization /Organización Mundial de la Salud. 2008. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs, *Microbiological Risk Assessment Series*, Vol. 14.
- Farber, J. M. 1991. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology-a review. *Journal of Food Protection*, 54(1): 58-70.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condrón, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Mischczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., & Cerf, O. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2): 190-212.
- Feder, I., Wallace, F. M., Gray, J. T., Fratamico, P., Fedorka-Cray, P. J., Pearce, R. A., Call, J. E., Perrine, R., & Luchansky, J. B. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3): 380-383.
- Feng, P. C. H., Weagant, S. D., & Monday, S. R. 2001. Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1): 24-28.
- Feng, P. C. H., Jinneman, K., Scheutz, F., & Monday, S. R. 2011. Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18): 6699-6702.
- Ferens, W. A., & Hovde, C. J. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4): 465-487.
- Ferguson, D. D., Scheftel, J., Cronquist, A., Smith, K., Woo-Ming, A., Anderson, E., Knutsen, J., De, A. K., & Gershman, K. 2005. Temporally distinct *Escherichia coli* O157 outbreaks associated with alfalfa sprouts linked to a common seed source - Colorado and Minnesota, 2003. *Epidemiology and Infection*, 133(3): 439-447.
- Fernández, A. 2010. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) y enteropatógenicos (ECEP) en carne de vacuno. Facultad de Ciencias de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- Finlay, B. B., Rosenshine, I., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. 1992. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa-cells. *Infection and Immunity*, 60(6): 2541-2543.
- Fonseca, D., Mateus, H., Contrera, N. 2010. Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica. 1ª ed. Colección Lecciones Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Editorial Universidad del Rosario: Bogotá, Colombia, pp. 70.
- Francis, G. A., Thomas, C., & O'beirne, D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 34(1): 1-22.
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M. J., Follin, P., Muller, L., King, L. A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K., Krause, G., & Team, H. U. S. I. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine*, 365(19): 1771-1780.
- Frank, C., Milde-Busch, A., & Werber, D. 2014. Results of surveillance for infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) of serotype O104:H4 after the large outbreak in Germany, July to December 2011. *Eurosurveillance*, 19(14): 9-14.
- Fratamico, P. M., DebRoy, C., Miyamoto, T., & Liu, Y. 2009. PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 in food by targeting genes in the *E. coli* O145 O-antigen gene cluster and the Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 genes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(5): 605-611.

- Fratamico, P. M., Bagi, L. K., Cray Jr, W. C., Narang, N., Yan, X., Medina, M., & Liu, Y. 2011. Detection by multiplex real-time polymerase chain reaction assays and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 in ground beef. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(5): 601-607.
- Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., & Karch, H. 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infectious Diseases*, 185(1): 74-84.
- Friedrich, A. W., Borell, J., Bielaszewska, M., Fruth, A., Tschape, H., & Karch, H. 2003. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: Phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6): 2448-2453.
- Friesema, I. H. M., Sigmundsdottir, G., Van Der Zwaluw, K., Heuvelink, A., Schimmer, B., De Jager, C., Rump, B., Briem, H., Hardardottir, H., Atladottir, A., Gudmundsdottir, E., & Van Pelt, W. 2008. An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September-October 2007. *Euro Surveillance: Bulletin European sur les Maladies Transmissibles= European Communicable Disease Bulletin*, 13(50): 3029-3035.
- Friesema, I. H. M., van der Zwaluw, K., Schuurman, T., Kooistra-Smid, M., Franz, E., Van Duynhoven, Y., & Van Pelt, W. 2014. Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. *Eurosurveillance*, 19(17): 26-32.
- Frydendahl, K. 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Veterinary Microbiology*, 85(2): 169-182.
- Fukushima, H., Hashizume, T., Morita, Y., Tanaka, J., Azuma, K., Mizumoto, Y., Kaneno, M., Matsu-ura, M. O., Konma, K., & Kitani, T. 1999. Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatrics International*, 41(2): 213-217.
- Funk, J., Stoeber, H., Hauser, E., & Schmidt, H. 2013. Molecular analysis of subtilase cytotoxin genes of foodborne Shiga toxin-producing *Escherichia coli* reveals a new allelic subAB variant. *BMC Microbiology*, 13.
- Galland, J. C., Hyatt, D. R., Crupper, S. S., & Acheson, D. W. 2001. Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4): 1619-1627.
- Gannon, V. P., D'souza, S., Graham, T., King, R. K., Rahn, K., & Read, S. 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(3): 656-662.
- Garabal, J. I., González, E. A., Vázquez, F., Blanco, J., & Blanco, M. 1995. Toxigenic *Escherichia coli* in spanish piggeries from 1986 to 1991. *Veterinary Microbiology*, 47(1-2): 17-25.
- Garabal, J. I., González, E. A., Vázquez, F., Blanco, J., Blanco, M., & Blanco, J. E. 1996. Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. *Veterinary Microbiology*, 48(1-2): 113-123.
- García, E., Gago, L., & Fernández, J. L. 2006. Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. Informe de Vigilancia Tecnológica, pp. 143.
- García, I. 2009. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* diarreagénicos en carne de vacuno. Facultad de Ciencias de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*, 73(5): 2573-2585.
- Garrido, P., Blanco, M., Moreno-Paz, M., Briones, C., Dahbi, G., Blanco, J., & Parro, V. 2006. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: A new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clinical Chemistry*, 52(2): 192-201.
- Gassama-Sow, A., Sow, P. S., Guèye, M., Guèye-N'diaye, A., Perret, J. L., M'boup, S., & Aïdara-Kane, A. 2004. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. *Journal of Infectious Diseases*, 189(1): 75-78.
- Geldreich, E. E., Fox, K. R., Goodrich, J. A., Rice, E. W., Clark, R. M., & Swerdlow, D. L. 1992. Searching for a water-supply connection in the cabool, missouri disease outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Water Research*, 26(8): 1127-1137.
- Gelting, R. J., Baloch, M. A., Zarate-Bermúdez, M. A., & Selman, C. 2011. Irrigation water issues potentially related to the 2006 multistate *E. coli* O157:H7 outbreak associated with spinach. *Agricultural Water Management*, 98(9): 1395-1402.
- George, D.B., & Manges, A. R. 2010. A systematic review of outbreak and non-outbreak studies of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* causing community-acquired infections. *Epidemiology and Infection*, 138(12): 1679-1690.
- Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H. M., & Zimmerhackl, L. B. 2002. Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *Journal of Infectious Diseases*, 186: 493-500.
- Gerhardt, E., Masso, M., Paton, A. W., Paton, J. C., Zotta, E., & Ibarra, C. 2013. Inhibition of water absorption and selective damage to human colonic mucosa are induced

- by subtilase cytotoxin produced by *Escherichia coli* O113: H21. *Infection and Immunity*, 81(8): 2931-2937.
- Geser, N., Stephan, R., & Haechler, H. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Veterinary Research*, 8(1): 21.
- Goudousi, A., Bonura, C., Di Noto A.M., Mammina, C. 2015. Extended-Spectrum β -lactamase, AmpC-Producing, and Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in Retail Broiler Chicken Meat, Italy. *Foodborne Pathogens and Disease*. 12 (7): 619-625.
- Gill, C. O., Greer, G. G., & Dilts, B. D. 1998. Predicting the growth of *Escherichia coli* on displayed pork. *Food Microbiology*, 15(2): 235-242.
- Gillespie, I. A., Adak, G. K., O'Brien, S. J., & Bolton, F. J. 2003. Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992-2000. *Epidemiology and Infection*, 130(03): 461-468.
- Girardeau, J. P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Vernozy-Rozand, C., & Martin, C. 2005. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12): 6098-6107.
- Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M. F., Bertini, A., & Nordmann, P. 2007. Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14): 4681-4685.
- Girón, J. A., Ho, A. S. Y., & Schoolnik, G. K. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 254(5032): 710-713.
- Glass, K. A., Loeffelholz, J. M., Ford, J. P., & Doyle, M. P. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8): 2513-2516.
- Goffaux, F., China, B., Janssen, L., & Mainil, J. 2000. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Research in Microbiology*, 151(10): 865-871.
- Goh, S., Newman, C., Knowles, M., Bolton, F. J., Hollyoak, V., Richards, S., Daley, P., Counter, D., Smith, H. R., & Keppie, N. 2002. *E. coli* O157 phage type 21/28 outbreak in North Cumbria associated with pasteurized milk. *Epidemiology and Infection*, 129(3): 451-457.
- Gomariz, M., Robertson, M., Serrano, E., Iglesias, L., & Pérez-Trallero, E. 2000. Estudio de dos brotes de *E. coli* O157:H7 en Gipuzkoa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 18(S1): 84.
- Gomes, T. A. T., Rassi, V., Macdonald, K. L., Ramos, S., Trabulsi, L. R., Vieira, M. A. M., Guth, B. E. C., Candeias, J. A. N., Ivey, C., Toledo, M. R. F., & Blake, P. A. 1991. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao-Paulo, Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, 164(2): 331-337.
- Gomes, T. A. T., Irino, K., Girão, D. M., Girão, V. B., Guth, B. E., Vaz, T. M., Moreira, F. C., Chinarelli, S. H., & Vieira, M. A. 2004. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Emerging Infectious Diseases*, 10(10): 1851-1855.
- Gonçalves, A., Torres, C., Silva, N., Carneiro, C., Radhouani, H., Coelho, C., Araújo, C., Rodrigues, J., Vinué, L., Somalo, S., Poeta, P., & Igrejas, G. 2010. Genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a Portuguese intensive swine farm. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(12): 1569-1573.
- González, E. A., Vázquez, F., Garabal, J. I., & Blanco, J. 1995. Isolation of k88 antigen variants (AB, AC, AD) from porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* belonging to different serotypes. *Microbiology and Immunology*, 39(12): 937-942.
- Goosney, D. L., DeVinney, R., Pfuertner, R. A., Frey, E. A., Strynadka, N. C., & Finlay, B. B. 2000. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Current Biology*, 10(12): 735-738.
- Gordon, D. M. & Cowling, A. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology-SGM*, 149: 3575-3586.
- Gould, L. H. 2009. Update on the epidemiology of Shiga toxin-producing *E. coli* in the United States. Paper presented at the Annual Capital Area Food Protection Association Meeting, Centers for Disease Control and Prevention, Washington, DC.
- Griffin, P. M. & Tauxe, R. V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*, 13(1): 60-98.
- Grys, T. E., Siege, M. B., Lathem, W. W., & Welch, R. A. 2005. The *StcE* protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infection and Immunity*, 73(3): 1295-1303.
- Guarddon, M. 2013. Desarrollo de un Nuevo método de PCR en Tiempo Real para cualificar bacterias portadores de los genes tet(A) y tet(B). Aplicación a alimentos convencionales y ecológicos. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Guenther, S., Ewers, C., & Wieler, L. H. 2011. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution?. *Frontiers in Microbiology*, 2:246.
- Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe, M., Batsajkhan, N., Glupczynski, Y., Wieler, L. H., & Ewers, C. 2012. Comparable high rates of extended-spectrum-beta-

- lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. *PLoS One*, 7(12): e53039.
- Guinée, P. A. M., Jansen, W. H., Wadström, T., & Sellwood, R. 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In P. W. Leeww & P. A. M. Guinée (Eds.), *Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhoea: Current Topics in veterinary and animal Science*: 126-162. Holanda: Martinus Nijhoff Publishers. Springer.
- Gunzburg, S. T., Tornieporth, N. G., & Riley, L. W. 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5): 1375-1377.
- Gyles, C. L. 1994. *Escherichia coli* enterotoxins. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Gyles, C. L. (ed), CAB International Publishing Series: Wallingford, Oxon, UK, p.337.
- Hancock, D. D., Besser, T. E., Rice, D. H., Herriott, D. E., & Tarr, P. I. 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiology and Infection*, 118(02): 193-195.
- Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M., & Rice, D. 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology*, 66(1-2): 71-78.
- Harrison, C., Hanson, H., Reddy, V., Stavinsky, F., Kornstein, L., Chicaiza, L., Lee, L., & Balter, S. 2012. A series of unusual investigations: Three outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* in New York City. New York City Health/Council of State and Territorial Epidemiologists, Conference presentation.
- Hartl, D. L. & Dykhuizen, D. E. 1984. The population-genetics of *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 18: 31-68.
- Hashimoto, H., Mizukoshi, K., Nishi, M., Kawakita, T., Hasui, S., Kato, Y., Ueno, Y., Takeya, R., Okuda, N., & Takeda, T. 1999. Epidemic of gastrointestinal tract infection including hemorrhagic colitis attributable to Shiga toxin 1-producing *Escherichia coli* O118:H2 at a junior high school in Japan. *Pediatrics*, 103(1).
- Haus-Cheymol, R., Espie, E., Che, D., Vaillant, V., De Valk, H., & Desenclos, J. C. 2006. Association between indicators of cattle density and incidence of paediatric haemolytic-uraemic syndrome (HUS) in children under 15 years of age in France between 1996 and 2001: an ecological study. *Epidemiology and Infection*, 134(4): 712-718.
- Hayakawa, I., Kanno, T., Yoshiyama, K., & Fujio, Y. 1994. Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Food Science*, 59(1): 164-167.
- Hedberg, C. W., Savarino, S. J., Besser, J. M., Paulus, C. J., Thelen, V. M., Myers, L. J., Cameron, D. N., Barrett, T. J., Kaper, J. B., & Osterholm, M. T. 1997. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39: NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 176(6): 1625-1628.
- Herman, K. M., Hall, A. J., & Gould, L. H. 2015. Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. *Epidemiological Infection*, 20: 1-11.
- Hernández, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A., & Gomes, T. A. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 297(2): 137-149.
- Hernández, J. R., Martínez-Martínez, L., Canton, R., Coque, T. M., Pascual, A., & Spanish Grp Nosocomial, I. 2005. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5): 2122-2125.
- Herrera, A. 2005. Prevalencia y caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* diarreagénicos aislados de alimentos. Proyecto Fin de Carrera; Titulación de Ingeniería Técnica Agrícola en Industrias Agrarias y Alimentarias. Universidad de Santiago de Compostela.
- Herrera, A. 2008. Prevalencia y caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) y enteropatogénicos (ECEP) en carne de vacuno. Proyecto fin de carrera; Titulación Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela.
- Herrera, A. 2010. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* en carne de vacuno en Lugo (2005-2009). Trabajo de investigación para obtención de Diploma de Estudios Avanzados (DEA) por el Programa de Doctorado de Microbiología e Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela.
- Herrero, A. M., & Romero de Avila, M. 2006. Innovaciones en el proceso de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina*, 50(4): 71-74.
- Heuvelink, A. E., Van Den Biggelaar, F. L. A. M., Zwartkruis-Nahuis, J. T. M., Herbes, R. G., Huyben, R., Nagelkerke, N., Melchers, W. J. G., Monnens L. A. H., & De Boer, E. 1998. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12): 3480-3487.
- Heuvelink, A. E., Zwartkruis-Nahuis, J. T. M., van den Biggelaar, F., van Leeuwen, W. J., & de Boer, E. 1999. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 52(1-2): 67-75.
- Hickey, C. D., Sheehan, J. J., Wilkinson, M. G., & Auty, M. A. 2015. Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. *Frontiers in Microbiology*, 6(99): 1-8.
- Hilborn, E. D., Mermin, J. H., Mshar, P. A., Hadler, J. L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M. A., Farrar, J. A., Glynn, M. K., & Slutsker, L. 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of

- mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine*, 159(15): 1758-1764.
- Honish, L., Predy, G., Hislop, N., Chui, L., Kowalewska-Grochowska, K., Trottier, L., Kreplin, C., Zazulak, I. 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Can. J. Public Health*. 96(3):182-4.
- Horcajo, P., Dominguez-Bernal, G., de la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G., López, C., Puentes, B., Pilar Alonso, M., Blanco, J., & Orden, J. A. 2012. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. *Veterinary Microbiology*, 155(2-4): 341-348.
- Hornitzky, M. A., Mercieca, K., Bettelheim, K. A., & Djordjevic, S. P. 2005. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing E-coli strains that commonly possess intimin. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 3405-3412.
- Horton, R. A., Randall, L. P., Snary, E. L., Cockrem, H., Lotz, S., Wearing, H., Duncan, D., Rabie, A., McLaren, I., Watson, E., La Ragione, R. M., & Coldham, N. G. 2011. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11): 3715-3719.
- Houdouin, V., Bonacorsi, S., Bidet, P., Blanco, J., De La Rocque, F., Cohen, R., Aujard, Y., & Bingen, E. 2008. Association between mortality of *Escherichia coli* meningitis in young infants and non-virulent clonal groups of strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(7): 685-690.
- Hrudey, S. E., Payment, P., Huck, P. M., Gillham, R. W., & Hrudey, E. J. 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Science and Technology*, 47(3): 7-14.
- Hu, J. K., Seo, J., & Choe, Y. J. 2013. Outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169 enteritis in schoolchildren associated with consumption of kimchi, Republic of Korea, 2012. *Epidemiological Infection*, 142: 616-623.
- Hussein, H. S. & Bollinger, L. M. 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *Journal of Food Protection*, 10: 2012-2241.
- Hussein, H. S. 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science*, 85: E63-E72.
- Ibarra-Sánchez, L. S., Alvarado-Casillas, S., Rodríguez-García, M. O., Martínez-Gonzales, N. E., & Castillo, A. 2004. Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. *Journal of Food Protection*, 67(7): 1353-1358.
- Iglesias, N. Pendiente de presentar. Prevalencia de *E. coli* diarreagénico en sujetos con diarrea del viajero: análisis de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ihekweazu, C., Carroll, K., Adak, B., Smith, G., Pritchard, G. C., Gillespie, I. A., Verlander, N. Q., Harvey-Vince, L., Reacher, M., Edeghere, O., Sultan, B., Cooper, R., Morgan, G., Kinross, P. T. N., Boxall, N. S., Iversen, A., & Bickler, G. 2012. Large outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in visitors to a petting farm in South East England, 2009. *Epidemiology and Infection*, 140(08): 1400-1413.
- Ikeda, K., Ida, O., Kimoto, K., Takatorige, T., Nakanishi, N., & Tataru, K. 1999. Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Clinical Nephrology*, 52(6): 357-362.
- Illinois Department of Health. 1999. Petersburg *E. coli* outbreak trace of beef. Illinois Department of Public Health.
- Instituto de Salud Carlos III, Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Economía y Competitividad, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 2013a. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. informe anual. Año 2010. Centro Nacional De Epidemiología.
- Instituto de Salud Carlos III, Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Economía y Competitividad, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 2013b. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. informe anual. Año 2011. Centro Nacional De Epidemiología.
- Instituto de Salud Carlos III, Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Economía y Competitividad, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 2015. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. informe anual. Año 2012. Centro Nacional De Epidemiología.
- Irino, K., Kato, M., Vaz, T. M. I., Ramos, I. I., Souza, M. A. C., Cruz, A. S., Gomes, T. A. T., Vieira, M. A. M., & Guth, B. E. C. 2005. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, 105(1): 29-36.
- Ishii, S., Meyer, K. P., & Sadowsky, M. J. 2007. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18): 5703-5710.
- Ishii, Y., Kimura, S., Alba, J., Shiroto, K., Otsuka, M., Hashizume, N., Tamura, K., & Yamaguchi, K. 2005. Extended-spectrum β -lactamase-producing shiga toxin gene (stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new

- concern. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3): 1072-1075.
- ISO, International Organization for Standardization. 2012. ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed -Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. International Organization for Standardization, ISO Central Secretariat, Geneva, Switzerland.
- Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H., & Kumagai, S. 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4): 1532-1535.
- Izumikawa, K., Hirakata, Y., Yamaguchi, T., Yoshida, R., Nakano, M., Matsuda, J., Mochida, C., Maesaki, S., Tomono, K., Yamada, Y., Tashiro, T., Kohno, S., & Kamihira, S. 1998. Analysis of Genetic Relationships and Antimicrobial Susceptibility of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated in Nagasaki Prefecture, Japan in 1996. *Microbiology and Immunology*, 42(10): 677-681.
- Jakobsen, L., Hammerum, A. M., & Frimodt-Møller, N. 2010. Virulence of *Escherichia coli* B2 isolates from meat and animals in a murine model of ascending urinary tract infection (UTI): evidence that UTI is a zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8): 2978-2980.
- Jakobsen, L., Garneau, P., Bruant, G., Harel, J., Olsen, S. S., Porsbo, L. J., Hammerum, A. M., & Frimodt-Møller, N. 2012. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(6): 1121-1129.
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in enterobacteriaceae -hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4): 867-878.
- Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X., & Brisse, S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9(1): 560.
- Javaloyas, M., García-Somoza, D., & Gudíol, F. 2003. Bacteriemia por *Escherichia coli*: análisis epidemiológico y de la sensibilidad a los antibióticos en un hospital comarcal. *Medicina Clínica*, 120(4): 125-127.
- Jelacic, J. K., Damrow, T., Chen, G. S., Jelacic, S., Bielaszewska, M., Ciol, M., Caralho, H. M., Melton-Celsa, A. R., O'Brien, A. D., & Tarr, P. I. 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *Journal of Infectious Diseases*, 188(5): 719-729.
- Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D., & Kaper, J. B. 1990. A genetic-locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue-culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(20): 7839-7843.
- Jo, M. Y., Kim, J. H., Lim, J. H., Kang, M. Y., Koh, H. B., Park, Y. H., Yoon, D. Y., Chae, J. S., Eo, S. K., & Lee, J. H. 2004. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, 95(1): 41-49.
- Johnsen, G., Wasteson, Y., Heir, E., Berget, O. I., & Herikstad, H. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *International Journal of Food Microbiology*, 65(3): 193-200.
- Johnson, J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1): 80-128.
- Johnson, J. R., Stapleton, A. E., Russo, T. A., Scheutz, F., Brown, J. J., & Maslow, J. N. 1997. Characteristics and prevalence within serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of papG. *Infection and Immunity*, 65(6): 2153-2159.
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases*, 181(1): 261-272.
- Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., & Stell, A. L. 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, iha and ironE. coli, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*, 68(5): 3040-3047.
- Johnson, J. R., Murray, A. C., Gajewski, A., Sullivan, M., Snippes, P., Kuskowski, M. A., & Smith, K. E. 2003a. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7): 2161-2168.
- Johnson, J. R., Gajewski, A., Lesse, A. J., & Russo, T. A. 2003b. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12): 5798-5802.
- Johnson, J. R., & O'Bryan, T. T. 2004. Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis gene kpsM by a rapid and specific PCR-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4): 1773-1776.
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Smith, K., O'Bryan, T. T., & Tatini, S. 2005. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *Journal of Infectious Diseases*, 191(7): 1040-1049.
- Johnson, J. R., Johnston, B., Clabots, C. R., Kuskowski, M. A., Roberts, E., & DebRoy, C. 2008. Virulence genotypes

- and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2): 417-422.
- Johnson, J. R., Menard, M., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Nichol, K., & Zhanel, G. G. 2009a. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7): 2733-2739.
- Johnson, J. R., Miller, S., Johnston, B., Clabots, C., & DebRoy, C. 2009b. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11): 3721-3725.
- Johnson, J. R., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M. A., & Castanheira, M. 2010. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 51(3): 286-294.
- Johnson, J. R., Nicolas-Chanoine, M. H., DebRoy, C., Castanheira, M., Robicsek, A., Hansen, G., Weissman, S., Urban, C., Platell, J., Trott, D., Zhanel, G., Clabots, C., Johnston, B. D., Kuskowski, M. A., & Master Investigators. 2012. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4): 598-607.
- Johnson, R. P., Clarke, R. C., Wilson, J. B., Read, S. C., Rahn, K., Renwick, S. A., Sandhu, K. A., Alves, D., Karmali, M. A., Lior, H., McEwen, S. A., Spika, J. S., & Gyles, C. L. 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 59(10): 1112-1122.
- Jones G.L., Warren R.E., Skidmore, S. J., Davies, V. A., Gibreel, T., & Upton, M. 2008. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6): 1245-1251.
- Jones, I. G. & Roworth, M. 1996. An outbreak of *Escherichia coli* O157 and Campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health*, 110(5): 277-282.
- Jones, T., Gill, C. O., & McMullen, L. M. 2003. Behaviour of log-phase *Escherichia coli* at temperatures near the minimum for growth. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1): 55-61.
- Jouini, A., Vinué, L., Slama, K.B., Sáenz, Y., Klibi, N., Hammami, S., Boudabous, A., Torres, C. 2007. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum b-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60:1137-1141.
- Ju, W., Shen, J., Li, Y., Toro, M. A., Zhao, S., Ayers, S., Najjar, M. B., & Meng, J. 2012. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail ground beef and pork in the Washington DC area. *Food Microbiology*, 32(2): 371-377.
- Justel, P. 2005. Serotipos, genes de virulencia y tipado molecular (PFGE) de *Escherichia coli* verotoxigénicos aislados de carne de vacuno en Lugo (2003-2005). Trabajo de investigación para obtención Diploma de Estudios Avanzados por el Programa de Doctorado de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela.
- Kandror, O., & Goldberg, A. L. 1997. Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10): 4978-4981.
- Kaper, J. B. 1996. Defining EPEC. *Revista De Microbiologia*, 27: 130-133.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2): 123-140.
- Käppeli, U., Hächler, H., Giezendanner, N., Cheasty, T., & Stephan, R. 2011. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with human infections in Switzerland, 2000-2009. *Epidemiology and Infection*, 139(07): 1097-1104.
- Karama, M., & Gyles, C. L. 2010. Methods for Genotyping Verotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Zoonoses and Public Health*, 57(7-8): 447-462.
- Karch, H., Friedrich, A. W., Gerber, A., Zimmerhackl, L. B., Schmidt, M. A., & Bielaszewska, M. 2006. New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32(2): 105-112.
- Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(1): 15-38.
- Karmali, M. A., Petric, M., & Bielaszewska, M. 1999. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2): 396-399.
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S. H., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clarks, C., Rahn, K., & Kaper, J. B. 2003. Association of genomic O(-) island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11): 4930-4940.
- Kaspar, C., Doyle, M. E., & Archer, J. 2010. White paper on non-O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. *Fri Food Safety Reviews*. Food Research Institute, UW-Madison: 1-26.
- Kato, K., Shimoura, R., Nashimura, K., Yoshifuzi, K., Shiroshita, K., Sakurai, N., Kodama, H., & Kuramoto, S. 2005. Outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 among high school participants in excursion to Korea. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58(5): 332-333.
- Kauffmann, F. 1947. The serology of the coli group. *Journal of Immunology*, 57(1): 71-100.

- Kauppi, K. L., Tatini, S. R., Harrell, F., & Feng, P. 1996. Influence of substrate and low temperature on growth and survival of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 13(5): 397-405.
- Kawamura, K., Goto, K., Nakane, K., & Arakawa, Y. 2014. Molecular Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(2): 104-110.
- Kegode, R. B., Doetkott, D. K., Khaita, M. L., & Wesley, I. V. 2008. Occurrence of *Campylobacter* species, *Salmonella* species and generic *Escherichia coli* in meat products from retail outlets in the Fargo metropolitan area. *Journal of Food Safety*, 28(1), 111-125.
- Kehl, S. C. 2002. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8): 2711-2715.
- Kerner, K., Bridger, P. S., Köpf, G., Fröhlich, J., Barth, S., Willems, H., Bauerfeind, R., Baljer, G., & Menge, C. 2015. Evaluation of biological safety in vitro and immunogenicity in vivo of recombinant *Escherichia coli* Shiga toxoids as candidate vaccines in cattle. *Veterinary Research*, 46(1), 38.
- Keskimäki, M., Eklund, M., Pesonen, H., Heiskanen, T., & Siitonen, A. 2001. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 40(4): 151-156.
- Khan, A., Das, S. C., Ramamurthy, T., Sikdar, A., Khanam, J., Yamasaki, S., Takeda, Y., & Nair, G. B. 2002. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6): 2009-2015.
- Kluytmans, J. A. J. W., Overvest, I. T. M. A., Willemsen, I., Kluytmans-van den Bergh, M. F. Q., van der Zwaluw, K., Heck, M., Rijnsburger, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Savelkoul, P. H. M., Johnston, B. D., Gordon, D., & Johnson, J. R. 2013. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clinical Infectious Diseases*, 56(4): 478-487.
- Knight, P. 1993. Hemorrhagic *E. coli*: The danger increases. *ASM American Society for Microbiology News*, 59(5): 247-250.
- Kobayashi, N., Lee, K.-i., Yamazaki, A., Saito, S., Furukawa, I., Kono, T., Maeda, E., Isobe, J., Sugita-Konishi, Y., & Hara-Kudo, Y. 2013. Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12): 4022-4028.
- Konowalchuk, J., Speirs, J. I., & Stavric, S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 18(3): 775-779.
- Koohmaraie, M., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Guerini, M., Shackelford, S. D., & Wheeler, T. L. 2005. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*, 71(1): 79-91.
- Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S. B., & Mäkelä, P. H. 1985. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infection and Immunity*, 48(2): 486-491.
- Krause, G., Zimmermann, S., & Beutin, L. 2005. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Veterinary Microbiology*, 106(1-2): 87-95.
- Kruis, W. 2004. Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 20: 75-78.
- La Ragione, R. M., Ahmed, N. M. Y., Best, A., Clifford, D., Weyer, U., Cooley, W. A., Johnson, L., Pearson, G. R., & Woodward, M. J. 2005. Colonization of 8-week-old conventionally reared goats by *Escherichia coli* O157:H7 after oral inoculation. *Journal of Medical Microbiology*, 54(5): 485-492.
- Langer, A. J., Ayers, T., Grass, J., Lynch, M., Angulo, F. J., & Mahon, B. E. 2012. Non-pasteurized dairy products, disease outbreaks, and State Laws-United States, 1993-2006. *Emerging Infectious Diseases*, 18(3): 385-391.
- Large, T. M., Walk, S. T., & Whittam, T. S. 2005. Variation in acid resistance among Shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5): 2493-2500.
- Lavilla, S., González-López, J. J., Miro, E., Dominguez, A., Llagostera, M., Bartolome, R. M., Mirelis, B., Navarro, F., & Prats, G. 2008. Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6): 1244-1251.
- Lazarus, B., Paterson, D., Mollinger, J.L., Rogers, A. 2015. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A Systematic review. *Clinical Infectious Disease*, 60 (3): 439-452.
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., & Labigne, A. 1992. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5): 1189-1193.
- Leclercq, A. & Mahillon, J. 2003. Farmed rabbits and ducks as vectors for VTEC O157:H7. *Veterinary Record*, 152(23): 723-724.
- Lee, G. Y., Jang, H. I., Hwang, I. G., & Rhee, M. S. 2009. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3): 196-200.

- Lee, S. H., Levy, D. A., Craun, G. F., Beach, M. J., & Calderon, R. L. 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, DC, 51(8): 1-47.
- Leflon-Guibout, V., Jurand, C., Bonacorsi, S., Espinasse, F., Guelfi, M. C., Duportail, F., Heym, B., Bingen, E., & Nicolas-Chanoine, M-H. 2004. Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48: 3736-42.
- Leflon-Guibout, V., Blanco, J., Amaqdouf, K., Mora, A., Guize, L., Nicolas-Chanoine, M-H. 2008. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:3900-3905.
- Leomil, L., de Castro, A. F. P., Krause, G., Schmidt, H., & Beutin, L. 2005. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. *FEMS Microbiology Letters*, 249(2): 335-342.
- Leung, P. H. M., Peiris, J. S. M., Ng, W. W. S., Robins-Browne, R. M., Bettelheim, K. A., & Yam, W. C. 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12): 7549-7553.
- Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Stuart, J. C., Voets, G. M., Van den Munckhof, M. P., Van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A. C., van de Sande-Bruinsma, N., Scharinga, J., Bonten, M. J. M., Mevius, D. J., & Natl, E. S. G. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(6): 873-880.
- Levine, M. M., Nalin, D. R., Hornick, R. B., Bergquist, E. J., Waterman, D. H., Young, C. R., Sotman, S., & Rowe, B. 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*, 1(8074): 1119-1122.
- Liebana, E., Smith, R. P., Batchelor, M., McLaren, I., Cassar, C., Clifton-Hadley, F. A., & Paiba, G. A. 2005. Persistence of *Escherichia coli* O157 isolates on bovine farms in England and Wales. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2): 898-902.
- Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J. 2010. A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1): 5-14.
- Lin, A., Nguyen, L., Lee, T., Clotilde, L. M., Kase, J. A., Son, I., Carter, J. M., & Lauzon, C. R. 2011. Rapid O serogroup identification of the ten most clinically relevant STECs by Luminex microbead-based suspension array. *Journal of Microbiological Methods*, 87(1): 105-110.
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4): 1875-1883.
- Line, J. E., Fain, A. R., Moran, A. B., Martin, L. M., Lechowich, R. V., Carosella, J. M., & Brown, W. L. 1991. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7 - d-value and z-value determinations in ground-beef. *Journal of Food Protection*, 54(10): 762-766.
- Linton, R. H., Carter, W. H., Pierson, M. D., & Hackney, C. R. 1995. Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 58(9): 946-954.
- Liu, Y., DebRoy, C., & Fratamico, P. 2007. Sequencing and analysis of the *Escherichia coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences. *Molecular and Cellular Probes*, 21(4): 295-302.
- Lockary, V. M., Hudson, R. F., & Ball, C. L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Idaho. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8): 1262-1264.
- Locking, M. E., Pollock, K. G., Allison, L. J., Rae, L., Hanson, M. F., & Cowden, J. M. 2011. *Escherichia coli* O157 infection and secondary spread, Scotland, 1999-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3): 524-527.
- Long, S. M., Adak, G. K., O'Brien, S. J., & Gillespie, I. A. 2002. General outbreaks of infectious intestinal disease linked with salad vegetables and fruit, England and Wales, 1992-2000. *Communicable Disease and Public Health/PHLS*, 5(2): 101-105.
- López, C. 2004. Serotipos, genes de virulencia, tipos de intiminas y perfiles de PFGE de *Escherichia coli* verotoxigénicos aislados de carne de vacuno. Proyecto fin de carrera de Ingeniería Agrónoma. Escuela Politécnica Superior de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- López, C., Dahbi, G., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Pita, J. M., Alonso, M. P., Coira, M. A., Herrera, A., Echeita, M. A., & Blanco, J. 2007. Prevalencia, serotipos, fagotipos, genes de virulencia, tipos de intiminas y perfiles de PFGE de *Escherichia coli* diarregénicos en coprocultivos (2006), XII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Clínica, 25. A Coruña, 9-11 de Mayo 2007.
- Losada, A. 2005. Serotipos, genes de virulencia y tipado de intiminas de *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECTV) y enteropatogénicos (ECEP). Facultad de Ciencias de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- Luchansky, J. B., Porto-Fett, A. C. S., Shoyer, B. A., Thippareddi, H., Amaya, J. R., & Lemler, M. 2014. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* Cells in mechanically tenderized veal. *Journal of Food Protection*, 77(7): 1201-1206.

- MacDonald, D. M., Fyfe, M., Paccagnella, A., Trinidad, A., Louie, K., & Patrick, D. 2004. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiology and Infection*, 132(2): 283-289.
- MacDonald, E., Møller, K. E., Wester, A. L., Dahle, U. R., Hermansen, N. O., Jennum, P. A., Thoresen L., & Vold, L. 2015. An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection in Norway, 2012: a reminder to consider uncommon pathogens in outbreaks involving imported products. *Epidemiology and Infection*, 143(03): 486-493.
- McKellar, R. C., & Knight, K. P. 1999. Growth and survival of various strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in hydrochloric and acetic acid. *Journal of Food Protection*, 62(12): 1466-1469.
- Madec, J. Y., Lazizzera, C., Châtre, P., Meunier, D., Martin, S., Lepage, G., Ménard, M. F., Lebreton, P., & Rambaud, T. 2008. Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae strains from cattle in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4): 1566-1567.
- Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Oswald, E., Fach, P., Jamet, E., & Auvray, F. 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) fliC alleles and intimin (eae) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5): 1696-1705.
- Madic, J., Vingadassalon, N., de Garam, C.P., Marault, M., Scheutz, F., Brugere, H., Jamet, E., Auvray, F. 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk chesse by using multiplex real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2035-2041.
- Magwedere, K., Huu Anh, D., Mills, E. W., Cutter, C. N., Roberts, E. L., & DebrRoy, C. 2013. Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in beef, pork, chicken, deer, boar, bison, and rabbit retail meat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(2): 254-258.
- Makino, S., Kobori, H., Asakura, H., Watarai, M., Shirahata, T., Ikeda, T., Takeshi, K., & Tsukamoto, T. 2000. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiology and Infection*, 125(1): 55-61.
- Malik, A., Toth, I., Beutin, L., Schmidt, H., Taminiau, B., Dow, M. A., Morabito, S., Oswald, E., Mainild, J., & Nagy, B. 2006. Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of eae(+) *Escherichia coli* from weaned pigs. *Veterinary Microbiology*, 114(1-2): 82-93.
- Mamani, R. S. 2014. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 y de otros clones causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos. Genes de virulencia y de resistencia. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Manges, A. R., Johnson, J. R., Foxman, B., O'Bryan, T. T., Fullerton, K. E., & Riley, L. W. 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *New England Journal of Medicine*, 345(14): 1007-1013.
- Manges, A. R., Tabor, H., Tellier, P., Vincent, C., & Tellier, P. P. 2008. Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10): 1575-1583.
- Manges, A. R., & Johnson, J. R. 2012. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clinical Infectious Diseases*, cis502.
- Marc, D., & Dho-Moulin, M. 1996. Analysis of the fim cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within fimA and nucleotide sequence of fimI. *Journal of Medical Microbiology*, 44(6): 444-452.
- Marek, P., Nair, M. K. M., Hoagland, T., & Venkitanarayanan, K. 2004. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1): 1-7.
- Margot, H., Cernela, N., Iversen, C., Zweifel, C., & Stephan, R. 2013. Evaluation of seven different commercially available real-time PCR assays for detection of Shiga toxin 1 and 2 gene subtypes. *Journal of Food Protection*, 76(5): 871-873.
- Markland, S. M., LeStrange, K. J., Sharma, M., & Kniel, K. E. 2015. Old Friends in New Places: Exploring the Role of Extraintestinal *E. coli* in Intestinal Disease and Foodborne Illness. *Zoonoses Public Health*. Apr 27. doi: 10.1111/zph.12194.
- Martin, A., & Beutin, L. 2011. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1): 99-104.
- Martínez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, J., García-Gil, L. J., & Darfeuille-Michaud, A. 2009. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(6): 872-882.
- Massa, S., Goffredo, E., Altieri, C., & Natola, K. 1999. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 C. *Letters in Applied Microbiology*, 28(1): 89.
- Mathers A.J., Peirano G., Pitout J.D. 2015. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*; 28(3):565-591.
- Matsumura, Y., Yamamoto, M., Nagao, M., Hotta, G., Matsushima, A., Ito, Y., Takakura, S., & Ichiyama, S. 2012. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-

- spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11): 2612-2620.
- Maule, A. 1999. Environmental survival of *Escherichia coli* O157: Implications for spread of disease. In G. Duffy & P. Garvey & J. Coia & Y. Wasteson & D. A. McDowell (Eds.), *Verocytotoxigenic E. coli in Europe*, 2. Survival and Growth of Verocytotoxigenic *E. coli*. Concerted Action CT98-3935.: 8-17. Dublin: Teagasc, The National Food Centre.
- Mayrhofer, S., Paulsen, P., Smulders, F.J., Hilbert, F. 2004. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *International Journal of Food Microbiology*. 97, 23-29.
- McKellar, R. C. & Knight, K. P. 1999. Growth and survival of various strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in hydrochloric and acetic acid. *Journal of Food Protection*, 62(12): 1466-1469.
- Meichtri, L., Miliwebsky, E., Gioffre, A., Chinen, I., Baschkier, A., Chillemi, G., Guth, B. E. C., Masana, M. O., Cataldi, A., Rodríguez, H. R., & Rivas, M. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *International Journal of Food Microbiology*, 96(2): 189-198.
- Melkebeek, V., Goddeeris, B. M., & Cox, E. 2013. ETEC vaccination in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1): 37-42.
- Mellmann, A., Bielaszewska, M., Koeck, R., Friedrich, A. W., Fruth, A., Middendorf, B., Harmsen, D., Schmidt, M. A., & Karch, H. 2008. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8): 1287-1290.
- Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E., & Caniça, M. 2007. Spread of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6): 1946-1955.
- Meng, J. H., Zhao, S. H., & Doyle, M. P. 1998. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. *International Journal of Food Microbiology*, 45(3): 229-235.
- Menne, J., Nitschke, M., Stingle, R., Abu-Tair, M., Beneke, J., Bramstedt, J., et al. 2012. Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case-control study. *BMJ*, 345: e4565.
- Menrath, A., Wieler, L. H., Heidemanns, K., Semmler, T., Fruth, A., & Kemper, N. 2010. Shiga toxin producing *Escherichia coli*: identification of non-O157:H7-Super-Shedding cows and related risk factors. *Gut Pathogens*, 2:7.
- Mercado, E. C., Gioffre, A., Rodríguez, S. M., Cataldi, A., Irino, K., Elizondo, A. M., Cipolla, A. L., Romano, M. I., Malena, R., & Mendez, M. A. 2004. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 51(2): 82-88.
- Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., & Yanagawa, H. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150(8): 787-796.
- Milon, A., Esslinger, J., & Camguilhem, R. 1990. Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and HeLa cells. *Infection and Immunity*, 58(8): 2690-2695.
- Mohle-Boetani, J. C., Farrar, J. A., Werner, S. B., Minassian, D., Bryant, R., Abbott, S., Slutsker, L., Vugia, D. J., & Investigation, T. 2001. *Escherichia coli* O157 and Salmonella infections associated with sprouts in California, 1996-1998. *Annals of International Medicine*, 135(4): 239-247.
- Montet, M.P., Jamet, E., Ganet, S., Dizin, M., Miszczycha, S., Duniere, L., Thevenot, D., Vernozy-Rozand, C. 2009. Growth and survival of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *International Journal of Microbiology*, vol: 2009, ID 653481, pp. 10.
- Mora, A. 2002. *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) O157:H7 y no O157. Prevalencia, serotipos, fagotipos, genes de virulencia, tipos de intiminas, perfiles de PFGE y resistencia a antibióticos de ECVT de origen humano y animal. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Mora, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Dhahi, G., Alonso, M. P., González, E. A., Bernárdez, M. I., & Blanco, J. 2003. Serotypes, virulence genes and intimins of VTEC isolated from raw beef products in Spain. Edinburgh: VTEC 2003 Conference Organisers.
- Mora, A., Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Dhahi, G., Thomson-Carter, F., Usera, M. A., Bartolomé, R., Prats, G., & Blanco, J. 2004. Phage types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9): 4007-4015.
- Mora, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Dhahi, G., Echeita, A., González, E. A., Bernárdez, M. I., & Blanco, J. 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology*, 156(7): 793-806.
- Mora, A., Blanco, M., Blanco, J. E., Dhahi, G., López, C., Justel, P., Alonso, M. P., Echeita, A., Bernárdez, M. I., González, E. A., & Blanco, J. 2007a. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in

- Lugo (Spain) from 1995 through 2003. BMC Microbiology, 7(13).
- Mora, A., León, S. L., Blanco, M., Blanco, J. E., López, C., Dahbi, G., Echeita, A., González, E. A., & Blanco, J. 2007b. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). International Journal of Food Microbiology, 114(2): 204-210.
- Mora, A., Blanco, M., Yamamoto, D., Dahbi, G., Blanco, J. E., López, C., Alonso, M. P., Vieira, M. A. M., Hernández, R. T., Abe, C. M., Piazza, R. M. F., Lacher, D. W., Elias, W. P., Gomes, T. A. T., & Blanco, J. 2009a. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. International Microbiology, 12(4): 243-251.
- Mora, A., López, C., Dahbi, G., Blanco, M., Blanco, J. E., Pilar Alonso, M., Herrera, A., Mamani, R., Bonacorsi, S., Moulin-Schouleur, M., & Blanco, J. 2009b. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. BMC Microbiology, 9(1): 132.
- Mora, A., Herrera, A., Mamani, R., López, C., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Blanco, M., Dahbi, G., García-Garrote, F., Maria Pita, J., Coira, A., Isabel Bernardez, M., & Blanco, J. 2010. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. Applied and Environmental Microbiology, 76(21): 6991-6997.
- Mora, A., Blanco, M., López, C., Mamani, R., Blanco, J. E., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dahbi, G., Herrera, A., Fernández, A., Fernández, B., Agulla A., Bou, G., & Blanco, J. 2011a. Emergence of clonal groups O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21, 42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain. International Journal of Antimicrobial Agents, 37(1): 16-21.
- Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J. M., Alonso, M. P., Llovo, J., Bernardez, M. I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. 2011b. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. International Microbiology, 14(3): 121-141.
- Mora, A., López, C., Dhahi, G., López-Beceiro, A. M., Fidalgo, L. E., Diaz, E. A., Martínez-Carrasco, C., Mamani, R., Herrera, A., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. 2012. Seropathotypes, phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. Applied and Environmental Microbiology, 78(8): 2578-2585.
- Mora, A., Viso, S., López, C., Pilar Alonso, M., García-Garrote, F., Dahbi, G., Mamani, R., Herrera, A., Marzoa, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., & Blanco, J. 2013. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. Veterinary Microbiology, 167(3-4): 506-512.
- Mora, A., Dahbi, G., López, C., Mamani, R., Marzoa, J., Dion, S., Picard, B., Blanco, M., Alonso, M. P., Denamur, E., & Blanco, J. 2014. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. PLoS one, 9(1): e87025.
- Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., & Caprioli, A. 1998. Enteroaggregative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111: H2 Associated with an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome. Journal of Clinical Microbiology, 36(3): 840-842.
- Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M. R., Brée, A., Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., & Blanco, J. 2006. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. Journal of Clinical Microbiology, 44(10): 3484-3492.
- Moura, R. A., Sircili, M. P., Leomil, L., Matte, M. H., Trabulsi, L. R., Elias, W. P., Irino, K., & Pestana de Castro, A. F. 2009. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. Applied and Environmental Microbiology, 75(23): 7399-7408.
- Moyo, S. J., Gro, N., Matee, M. I., Kitundu, J., Myrmel, H., Mylvaganam, H., Maselle, S. Y., & Langeland, N. 2011. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Pediatrics, 11(1): 19.
- Muehlherr, J. E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J. E., & Stephan, R. 2003. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. Journal of Dairy Science, 86(12): 3849-3856.
- Muniesa, M., de Simon, N., Prats, G., Ferrer, D., Panella, H., & Jofre, J. 2003. Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. Infection and Immunity, 71(8): 4554-4562.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. 2006. Microbiología Médica. Capítulo 20: Antibióticos, 5ª ed. Medical Microbiology. Elsevier, Mosby SA: Madrid, pp. 203-212.
- Nagy, B., & Fekete, P. Z. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in farm animals. Veterinary Research, 30: 259-284.
- Nakazato, G., Gyles, C., Ziebell, K., Keller, R., Trabulsi, L. R., Gomes, T. A. T., Irino, K., Dias da Silveira, W., & Pestana de Castro, A. 2004. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). Veterinary Microbiology, 101(4): 269-277.

- Nakazawa, M., Akiba, M., & Sameshima, T. 1999. Swine as a potential reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6): 833-834.
- Naseer, U., Haldorsen, B., Tofteland, S., Hegstad, K., Scheutz, F., Simonsen, G. S., & Sundsfjord, A. 2009. Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. *APMIS, Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 117(7): 526-536.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1): 142-201.
- Nataro, J. P. 2006. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli*: Typical pathogens? *Emerging Infectious Diseases*, 12(4): 696-696.
- National Institute of Infectious Diseases, Japan. 2012. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan as of April 2012. *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)*.
- Navarro, M. D. 2009. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de beta-lactamasas de espectro extendido. *Epidemiología clínica y molecular*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- NCCLS/CLSI, National Committee on Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing: 23rd informational supplement, M100-S23. NCCLS/CLSI, Wayne, PA.
- Neter, E., Korn, R. F., & Trussell, R. E. 1953a. Association of *Escherichia coli* serogroup-O111 with 2 hospital outbreaks of epidemic diarrhea of the newborn infant in New York State during 1947. *Pediatrics*, 12(4): 377-383.
- Neter, E., Zalewski, N. J., & Ferguson, W. W. 1953b. *Escherichia coli* hemagglutinin response of adult volunteers to ingested *E. coli*-O55-B5. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 82(2): 215-219.
- Neter, E. 1955. *Escherichia coli* diarrhea - an outbreak among infants on a surgical ward. *American Journal of Diseases of Children*, 89(5): 564-566.
- Neter, E., Westphal, O., Luderitz, O., Gino, R. M., & Gorzynski, E. A. 1955. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics*, 16(6): 801-808.
- New York State Department of Health. 2000. Health Commissioner releases *E. coli* outbreak report. The New York State Department of Health.
- Nguyen, R. N., Taylor, L. S., Tauschek, M., & Robins-Browne, R. M. 2006. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4): 597-603.
- Nguyen, T. D., Vo, T. T., & Vu-Khac, H. 2011. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *Journal of Veterinary Science*, 12(2): 159-164.
- Nguyen, T. V., Le Van, P., Le Huy, C., Gia, K. N., & Weintraub, A. 2005. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2): 755-760.
- Nguyen-the, C., & Carlin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(4): 371-401.
- Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Canica, M. M., Park, Y. J., Lavigne, J. P., Pitout, J., & Johnson, J. R. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2): 273-281.
- Nicolas-Chanoine M.H., Bertrand X., Madec J.Y., 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews* 27, 543-574.
- Nielsen, E. M., Scheutz, F., & Torpdahl, M. 2006. Continuous surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by pulsed-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic. *Foodborne Pathogens & Disease*, 3(1): 81-87.
- Nissen, H. & Nesbakken, T. 2001. Control of VTEC in the meat industry. In G. Duffy & P. Garvey & A. McDowell (Eds.), *Verocytotoxigenic E.coli*: 367-380. USA: Food and Nutrition Press.
- Nordstrom, L., Liu, C. M., & Price, L. B. 2013. Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. *Frontiers in Microbiology*, 4: 29.
- Novello, A. 1999. Public health dispatch: outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington County Fair-New York, 1999. *Morbidity Mortality and Weekly Report*, 48: 803-804.
- Núñez, M. 2003. Prevalencia, serotipos y genes devirulencia de *Escherichia coli* verotoxigénicos en carne de vacuno. Proyecto Fin de Carrera de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ochoa, T. J., Ecker, L., Barletta, F., Mispireta, M. L., Gil, A. I., Contreras, C., Molina, M., Amemiya, I., Verastegui, H., Hall, E. R., Cleary, T. G., & Lanata, C. F. 2009. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from Periurban areas in Lima, Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11): 1694-1702.
- O'Hanley, P. D., & Cantey, J. R. 1978. Surface structures of *Escherichia coli* that produce diarrhea by a variety of enteropathic mechanisms. *Infection and Immunity*, 21(3): 874-878.

- Ojer-Usoz, E., González, D., Isabel Vitas, A., Leiva, J., García-Jalón, I., Febles-Casquero, A., & de la Soledad Escolano, M. 2013. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Science*, 93(2): 316-321.
- Okeke, I. N. & Nataro, J. P. 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Lancet. Infectious diseases*, 1(5): 304-313.
- Okeke, I. N. 2009. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(11): 817-842.
- Okeke, I. N., Wallace-Gadsden, F., Simons, H. R., Matthews, N., Labar, A. S., Hwang, J., & Wain, J. 2010. Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. *PLoS One*, 5(11): e14093.
- Oklahoma State Department of Health. 2009. Epidemiological investigation of restaurant-associated *Escherichia coli* O111:NM outbreak- Mayes County, Oklahoma, 2008. Final report.
- Olesen, B., Scheutz, F., Menard, M., Skov, M. N., Kolmos, H. J., Kuskowski, M. A., & Johnson, J. R. 2009. Three-decade epidemiological analysis of *Escherichia coli* O15:K52:H1. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6): 1857-1862.
- Oliveira, M. G., Feitosa Brito, J. R., Tardelli Gomes, T. A., Cabilio Guth, B. E., Midolli Vieira, M. A., Furtado Naves, Z. V., Ibelli Vaz, T. M., & Irino, K. 2008. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2): 139-146.
- Oliveira, M., Usall, J., Viñas, I., Anguera, M., Gatiús, F., & Abadias, M. 2010. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, 27(5): 679-684.
- Oliveira, M., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., & Abadias, M. 2012. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology*, 156(2): 133-140.
- Oliver, A., & Cantón, R. 2003. Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido. Oliver, A., & Cantón, R. (2003). *Control de Calidad de la SEIMC, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1-10.
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2(2): 115-129.
- Olsen, S. J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., McKee, G., Fox, K., Bibb, W., & Mead, P. 2002. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: Implications for rural water systems. *Emerging Infectious Diseases*, 8(4): 370-375.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 1987. Program for Control of Diarrheal Diseases (CDD/83.3 Rev 1). Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections, Geneva, p. 27.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2005. The treatment of diarrhoea. Manual for physicians and other senior health workers. 4th rev: 44.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2008. Foodborne disease outbreak. Guidelines for investigation and control.
- Orden, J. A., Cid, D., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., García, S., Martínez, S., & De la Fuente, R. 2002. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 93(1): 29-35.
- Orden, J. A., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Cid, D., González, E. A., Blanco, J., & De la Fuente, R. 2003. Prevalence and characterization of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. *Epidemiology and Infection*, 130(02): 313-321.
- Orr, P., Lorencz, B., Brown, R., Kielly, R., Tan, B., Holton, D., Clugstone, H., Lugtig, L., Pim, C., Macdonald, S., Hammond, G., Moffatt, M., Spika, J., Manuel, D., Winther, W., Milley, D., Lior, H., & Sinuff, N. 1994. An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the canadian northwest-territories. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 26(6): 675-684.
- Orskov, F. & Orskov, I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology*, 14: 43-112.
- Orskov, I., & Orskov, F. 1985. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *Journal of Hygiene*, 95(03): 551-575.
- Ostroff, S. M., Kobayashi, J. M., & Lewis, J. H. 1989. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State: the first year of statewide disease surveillance. *JAMA, Journal of the American Medical Association*, 262(3): 355-359.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., & Caprioli, A. 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*, 68(1):64-71.
- Oteo, J., Navarro, C., Cercenado, E., Delgado-Iribarren, A., Wilhelmi, I., Orden, B., García, C., Miguelañez, S., Pérez-Vázquez, M., García-Cobos, S., Aracil, B., Bautista, V., & Campos, J. 2006. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7): 2359-2366.

- Otero, V., Rodríguez-Calleja, J. M., Otero, A., García-López, M. L., Santos, J. A. 2013. Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19):5864-5869.
- Otero, V. 2014. Incidencia, comportamiento y control de tipos de patógenos de *Escherichia coli* (STEC y EPEC) en leche y quesos de oveja. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Otero, V., Becerril, R., Santos, J. A., Rodríguez-Calleja, J. M., Nerín, C., & García-López, M. L. 2014. Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*, 42: 296-302.
- Overdeest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., van der Zwaluw, K., Huijsdens, X., & Kluytmans, J. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7): 1216-1222.
- Pabst, W. L., Altwegg, M., Kind, C., Mirjanic, S., Hardegger, D., & Nadal, D. 2003. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6): 2289-2293.
- Padhye, N. V., & Doyle, M. P. 1992. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*, 55(7): 555-565.
- Padola, N. L., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Etcheverría, A. I., Arroyo, G. H., Usera, M. A., & Parma, A. E. 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Veterinary Microbiology*, 100(1-2): 3-9.
- Palumbo, S. A., Call, J. E., Schultz, F. J., & Williams, A. C. 1995. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 58(4): 352-356.
- Paredes-Paredes, M., Okhuysen, P. C., Flores, J., Mohamed, J. A., Padda, R. S., Gonzalez-Estrada, A., Haley, C. A., Carlin, L. G., Nair, P., & DuPont, H. L. 2011. Seasonality of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in the US students acquiring diarrhea in Mexico. *Journal of Travel Medicine*, 18(2): 121-125.
- Parma, A. E., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Blanco, J., Vinas, M. R., Blanco, M., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina -Importance in public health. *European Journal of Epidemiology*, 16(8): 757-762.
- Parma, Y. R., Chacana, P. A., Lucchesi, P. M. A., Roge, A., Velandia, C. G., Krüger, A., Parma, A. E., & Fernández-Miyakawa, M. E. 2012. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using chicken egg yolk IgY antibodies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2:84.
- Parry, S. M., & Salmon, R. L. 1998. Sporadic STEC O157 infection: secondary household transmission in Wales. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 657-661.
- Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C., & Paton, J. C. 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and Immunity*, 69(11): 6999-7009.
- Paton, A. W., & Paton, J. C. 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1): 271-274.
- Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H., & Paton, J. C. 2004. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Medicine*, 200(1): 35-46.
- Paton, A. W., & Paton, J. C. 2005. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6): 2944-2947.
- Paton, J. C., & Paton, A. W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3): 450-479.
- Paton, J. C., & Paton, A. W. 2003. Methods for detection of STEC in humans. An overview. *Methods in Molecular Medicine*, 73: 9-26.
- Pebody, R. G., Furtado, C., Rojas, A., McCarthy, N., Nylen, G., Ruutu, P., Leino, T., Chalmers, R., de Jong, B., Donnelly, M., Fisher, I., Gilham, C., Graverson, L., Cheasty, T., Willshaw, G., Navarro, M., Salmon, R., Leinikki, P., Wall, P., & Bartlett, C. 1999. An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiology and Infection*, 123(2): 217-223.
- Peeters, J. E., Charlier, G. J., & Halen, P. H. 1984a. Pathogenicity of attaching effacing enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic suckling and weanling rabbits for newborn rabbits. *Infection and Immunity*, 46(3): 690-696.
- Peeters, J. E., Pohl, P., Okerman, L., & Devriese, L. A. 1984b. Pathogenic properties of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(1): 34-39.
- Peeters, J. E. 1993. *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) du lapin. *Annales de Médecine Veterinaire*, 137:361-368.
- Pennington, H. 1998. Factors involved in recent outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 in Scotland and

- recommendations for its control. *Journal of Food Safety*, 18(4): 383-391.
- Penteado, A. S., Ugrinovich, L. A., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Andrade, J. R. C., Correa, S. S., & Pestana de Castro, A. 2002. Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 89(1): 41-51.
- Pignato, S., Coniglio, M.A., Faro, G., Weill, F.X., Giammanco, G.. 2009. Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *Journal of Water and Health*, 7, 251-258.
- Phadtare, S., Alsina, J., & Inouye, M. 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2): 175-180.
- Phillips, A. D., & Frankel, G. 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *Journal of Infectious Diseases*, 181(4): 1496-1500.
- Philips, D., Jordan, D., Morris, S., Jenson, I., Summer, J. 2008. A national survey of the microbiological quality of retail raw meats in Australia. *Journal of Food Protection*, 71(6):1232-6.
- Philips, D., Bridger, K., Jenson, I., Summer, J. 2012. An Australian national survey of the microbiological quality of frozen boneless beef and beef primal cuts. *J. Food Prod.* 74(10):1862-6.
- Pitout, J. D. D., Gregson, D. B., Church, D. L., Elsayed, S., & Laupland, K. B. 2005a. Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary Health Region. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6): 2844-2849.
- Pitout, J. D. D. & Laupland, K. B. 2008. Extended-spectrum betalactamase producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infectious Diseases*, 8(3): 159-166.
- Piva, I. C., Pereira, A. L., Ferraz, U. R., Silva, R. S. N., Vieira, A. C., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., & Giugliano, L. G. 2003. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5): 1827-1832.
- Platell, J. L., Johnson, J. R., Cobbold, R. N., & Trott, D. J. 2011. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2): 99-108.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J. B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B., & Forestier, C. 2000. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3): 1023-1031.
- Prager, R., Fruth, A., Siewert, U., Strutz, U., & Tschäpe, H. 2009. *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(5): 343-353.
- Prager, R., Fruth, A., Busch, U., & Tietze, E. 2011. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin STIa encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(3): 181-191.
- Price L.B., Johnson J.R., Aziz M., Clabots C., Johnston B., Tchesnokova V., Nordstrom L., Billig M., Chattopadhyay S., Stegger M., Andersen P.S., Pearson T., Riddell K., Rogers P., Scholes D., Kahl B., Keim P., Sokurenko E.V., 2013. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio*. 4:e00377-13
- Qadri, F., Svennerholm, A. M., Faruque, A. S. G., & Sack, R. B. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3): 465-483.
- Radford, S. A., & Board, R. G. 1993. Review: fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. *Food Microbiology*, 10(4): 269-278.
- Rajkhowa, S., & Sarma, D. K. 2014. Prevalence and antimicrobial resistance of porcine O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from India. *Tropical Animal Health and Production*, 46(6): 931-937.
- Ramonedo, M., Foncuberta, M., Simon, M., Sabate, S., Ferrer, M. D., Herrera, S., Landa, B., Muste, N., Marti, R., Trabado, V., Carbonell, O., Vila, M., Espelt, M., Ramirez, B., & Duran, J. 2013. Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 (VTEC O157) and compliance with microbiological safety standards in bovine carcasses from an industrial beef slaughter plant. *Letters in Applied Microbiology*, 56(6): 408-413.
- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., & Swerdlow, D. L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4): 603-609.
- Rao, L., Luchao, Lv., Zeng, Z., Chen, S., He, D., Chen, X., Wu, C., Wang, Y., Yang, T., Wu, P. 2014. Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003-2012. *Veterinary Microbiology*, 172 (2014) 534-541.
- Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A. A., & Tenover, F. C. 1997. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(3): 647-653.
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S., Mongodin, E. F., Fricke, W. F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebahia, M., Thomson, N. R., Chaudhuri, R., Henderson, I. R., Sparandio, R., & Ravel, J. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic

- analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology*, 190(20): 6881-6893.
- Rasmussen, M. A., Cray, W. C., Casey, T. A., & Whipp, S. C. 1993. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 114(1):79-84.
- Read, S.C., Gyles, C.L., Clarke, R.C., Lior, H., McEwen, S. 1990. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, chicken in south-western Ontario. *Epidemiology and Infection*. 105, 11-20.
- Reischl, U., Youssef, M. T., Kilwinski, J., Lehn, N., Zhang, W. L., Karch, H., & Strockbine, N. A. 2002. Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7): 2555-2565.
- Rengifo-Gonzales, L. I., & Ordoñez-Gomez, E. S. 2010. Efecto de la temperatura en la capacidad de retención de agua y pH en carne de res, cerdo, pollo, ovino, conejo y pescado paco. *ECIPerú*, 7(2):77-85.
- Reu, K. D., Grijspeerdt, K., & Herman, L. 2004. A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *Journal of Food Safety*, 24(1): 17-36.
- Reuland, E.A., Al Naiemi, N., Raadsen, S.A., Savelkoul, P.H.M., Kluytmans, J.A.J.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. 2014. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. 33, 1843-1846.
- Rey, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Usera, M. A., González, E. A., Bernárdez, M. I., & Blanco, J. 2003. Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Veterinary Microbiology*, 94(1): 47-56.
- Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J. E., de Mendoza, J. H., de Mendoza, M. H., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R., & Alonso, J. M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2): 212-217.
- Riaño, I., Moreno, M. A., Teshager, T., Sáenz, Y., Domínguez, L., & Torres, C. 2006. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(4): 844-847.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., & Cohen, M. L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, 308(12): 681-685.
- Ríos, M., Prado, V., Trucksis, M., Arellano, C., Borie, C., Alexandre, M., Fica, A., & Levine, M. M. 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3): 778-781.
- Rivas, M., Sosa -Estani, S., Rangel, J., Caletti, M. G., Vallés, P., Roldán, C. D., Balbi L., Marsano de Mollar, M. C., Amoedo, D., Miliwebsky, E., Chinen, I., Hoekstra, R. M., Mead, P., & Griffin, P. M. 2008. Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5): 763-771.
- Rivero, M. A., Passucci, J. A., Rodríguez, E. M., & Parma, A. E. 2012. Seasonal variation of HUS occurrence and VTEC infection in children with acute diarrhoea from Argentina. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(6): 1131-1135.
- Rodríguez-Baño, J., Navarro, M. D., Romero, L., Martínez-Martínez, L., Muniain, M. A., Perea, E. J., Pérez-Cano, R., & Pascual, A. 2004. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3): 1089-1094.
- Rodríguez-Baño, J., Navarro, M. D., Romero, L., Muniain, M. A., Perea, E. J., Pérez-Cano, R., Hernández, J. R., & Pascual, A. 2006. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: Implications for control. *Clinical Infectious Diseases*, 42(1): 37-45.
- Rodríguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., & Nolan, L. K. 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research*, 36(2): 241-256.
- Roest, H.I., Liebana, E., Wannet, W., van Duynhoven, Y., Veldman, K. T., & Mevius, D. J. 2007. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* O157 isolated between 1998 and 2003 in The Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskd*, 132(24): 954-8.
- Román, A. 2002. Calidad higiénico sanitaria de la carne de vacuno. Detección de *Escherichia coli* verotoxigénico O157:H7. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ruscica, M., & Sobol, R. 1998. *Escherichia coli* enterohemorrágica. La Alimentación Latinoamericana, 208: 35-40.
- Russo, T. A. & Johnson, J. R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 181(5): 1753-1754.
- Said, B. L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, K. A., Boudabous, A., Ben Slama, K., & Torres, C. 2015. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 203:86-92.

- Saladin, M., Lambert, T., Donay, J. L., Herrmann, J. L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., & Arlet, G. 2002. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2): 161-168.
- Salmon, R. 2005. Outbreak of verotoxin producing *E. coli* O157 infections involving over forty schools in south Wales, September 2005. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles =European Communicable Disease Bulletin*, 10(10): E051006.051001-E051006.051001.
- Samelis, J., Kakouri, A., & Rementzis, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 C. *Food Microbiology*, 17(3): 329-340.
- Samie, A., Obi, C. L., Dillingham, R., Pinkerton, R. C., & Guerrant, R. L. 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: Distribution of Virulence-Related Genes by Multiplex Polymerase Chain Reaction in Stool Samples of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Positive and HIV-Negative Individuals and Primary School Children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(1): 142-150.
- Sampson, R. W., Swiatnicki, S. A., McDermott, C. M., & Kleinheinz, G. T. 2005. *E. coli* at Lake Superior recreational beaches. *Journal of Great Lakes Research*, 31(1): 116-121.
- Sampson, R. W., Swiatnicki, S. A., Osinga, V., Supita, J., McDermott, C. M., & Kleinheinz, G. T. 2006. Effects of temperature and sand on *E. coli* survival in a northern lake water microcosm. *Journal of Water and Health*, 4: 389-393.
- Sánchez, S., García-Sánchez, A., Martínez, R., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Dahbi, G., Mora, A., Hermoso de Mendoza, J., Alonso, J. M., & Rey, J. 2009. Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants. *The Veterinary Journal*, 180(3): 384-388.
- Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Vidal, D., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Herrera-León, A., Echeita, A., Alonso, J. M., & Rey, J. 2010. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Veterinary Microbiology*, 143(2): 420-423.
- Sang, W. K., Oundo, V., & Schnabel, D. 2012. Prevalence and antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from childhood diarrhoea in four provinces of Kenya. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6(07): 572-578.
- Sanz, M. E., Vinas, M. R., & Parma, A. E. 1998. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *European Journal of Epidemiology*, 14(4): 399-403.
- Sarantuya, J., Nishi, J., Wakimoto, N., Erdene, S., Nataro, J. P., Sheikh, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M., Miyata, K., & Kawano, Y. 2004. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1): 133-139.
- Savageau, M. A. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *American Naturalist*, 732-744.
- Scaletsky, I. C., Aranda, K. R., Souza, T. B., Silva, N. P., & Morais, M. B. 2009. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11): 3756-3759.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1): 7-15.
- Scavia, G., Morabito, S., Tozzoli, R., Michelacci, V., Marziano, M. L., Minelli, F., Ferreri, C., Paglialonga, F., Edefonti, A., & Caprioli, A. 2011. Similarity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 Strains from Italy and Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10): 1957-1958.
- Scheutz, F., & Strockbine, N. A. 2005. Genus *E. coli*. In: Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (eds). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, (2nd ed), Springer: New York, pp. 607-624.
- Scheutz, F., Nielsen, E. M., Frimodt-Moller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., Nataro, J. P., & Caprioli, A. 2011. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Eurosurveillance*, 16(24): 5-10.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Persson, S., & O'Brien, A. D. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9): 2951-2963.
- Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H. M., Lassen, J., Lindstedt, B. A., Brandal, L. T., Kapperud, G., & Aavitsland, P. 2008. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infectious Diseases*, 8(1): 41.
- Schmidt, H., Beutin, L., & Karch, H. 1995a. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity*, 63(3): 1055-1061.
- Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J., & Karch, H. 1995b. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3): 701-705.
- Schmidt, H., Von Maldeghem, J., Frosch, M., & Karch, H. 1998. Antibiotic susceptibilities of verocytotoxin-

- producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains isolated from patients and healthy subjects in Germany during 1996. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(4): 548-550.
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L. H., & Karch, H. 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3): 1205-1208.
- Schouler, C., Schaeffer, B., Bree, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, J., & Moulin-Schouleur, M. 2012. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(5): 1673-1678.
- Schouten, J. M., Van de Giessen, A. W., Frankena, K., De Jong, M. C. M., & Graat, E. A. M. 2005. *Escherichia coli* O157 prevalence in Dutch poultry, pig finishing and veal herds and risk factors in Dutch veal herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 70(1-2): 1-15.
- Schroeder, C. M., Meng, J. H., Zhao, S. H., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, C. W., McDermott, P. F., Wagner, D. D., Walker, R. D., & White, D. G. 2002a. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 8(12): 1409-1414.
- Schroeder, C. M., Zhao, C. W., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S. H., White, D. G., Wagner, D. D., McDermott, P. F., Walker, R. D., & Meng, J. H. 2002b. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2): 576-581.
- Schultsz, C., Pool, G. J., Van Ketel, R., De Wever, B., Speelman, P., & Dankert, J. 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(10): 2393-2397.
- Schultsz, C., Van Den Ende, J., Cobelens, F., Vervoort, T., Van Gompel, A., Wetsteyn, J. C. F. M., & Dankert, J. 2000. Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10): 3550-3554.
- SCVPH, Scientific Committee on Veterinary measures relating to Public Health. 2003. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in foodstuffs: 1-64: European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General. Directorate C -Scientific Opinions C2 -Management of Scientific Committees; Scientific Cooperation and Networks.
- Segura-Álvarez, M., Richter, H., Conraths, F. J., & Geue, L. 2003. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays and a PCR test for detection of Shiga toxins for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle herds. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12): 5760-5763.
- Semenov, A. V., van Overbeek, L., & van Bruggen, A. H. 2009. Percolation and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10): 3206-3215.
- Semenov, A. V., Franz, E., & van Bruggen, A. H. 2010. COLIWAVE a simulation model for survival of *E. coli* O157:H7 in dairy manure and manure-amended soil. *Ecological Modelling*, 221(4): 599-609.
- Seto, K., Taguchi, M., Kobayashi, K., & Kozaki, S. 2007. Biochemical and molecular characterization of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka prefecture. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 69(12): 1215-22.
- Sharp, T. W., Thornton, S. A., Wallace, M. R., Defraites, R. F., Sánchez, J. L., Batchelor, R. A., Rozmajzl, P. J., Hanson, R. K., Echeverria, P., & Kapikian, A. Z. 1995. Diarrheal disease among military personnel during Operation Restore Hope, Somalia, 1992-1993. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(2): 188-193.
- Shaw, M. K., Marr, A. G., & Ingraham, J. L. 1971. Determination of the minimal temperature for growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 105(2): 683-684.
- Sheng, H. Q., Davis, M. A., Knecht, H. J., Hancock, D. D., Van Donkersgoed, J., & Hovde, C. J. 2005. Characterization of a Shiga toxin-, intimin-, and enterotoxin hemolysin-producing *Escherichia coli* ONT:H25 strain commonly isolated from healthy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7): 3213-3220.
- Sheridan, J. J. & McDowell, D. A. 1998. Factors affecting the emergence of pathogens on foods. *Meat Science*, 49: S151-S167.
- Simarro, E., Navarro, F., Ruiz, J., Miró, E., Gómez, J., & Mirelis, B. 2000. *Salmonella enterica* serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 4676-8.
- Simiyu, K. W., Gathura, P. B., Kyule, M. N., Kanja, L. W., & Ombui, J. N. 1998. Toxin production and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* river water isolates. *East African Medical Journal*, 75: 699-702.
- Sixma, T. K., Kalk, K. H., Vanzanten, B. A. M., Dauter, Z., Kingma, J., Witholt, B., & Hol, W. G. J. 1993. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera-toxin. *Journal of Molecular Biology*, 230(3): 890-918.
- Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157: H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4): 1646-1653.
- Slutsker, L., Ries, A. A., Greene, K. D., Wells, J. G., Hutwagner, L., & Griffin, P. M. 1997. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: Clinical and epidemiologic features. *Annals of Internal Medicine*, 126(7): 505-513.

- Smith, D. R. 2014 Vaccination of cattle against *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology Spectrum*, 2(6):EHEC-0006-2013.
- Smith, H. R., Gross, R. J., Rowe, B., Fry, N. K., & Scotland, S. M. 1987. Hemorrhagic colitis and vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* in England and Wales. *Lancet*, 1(8541): 1062-1065.
- Smith, J. J., Howington, J. P., & McFeters, G. A. 1994. Survival, physiological response and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8): 2977-2984.
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4: 134-163.
- Söderstrom, A., Lindberg, A., & Andersson, Y. 2005. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Euro Surveillance* : bBulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles-European Communicable Disease Bulletin, 10(9): E050922.
- Sodha, S. V., Heiman, K., Gould, L. H., Bishop, R., Iwamoto, M., Swerdlow, D. L., & Griffin, P. M. 2015. 0 National patterns of *Escherichia coli* O157 infections, USA, 1996-2011. *Epidemiology and Infection*, 143: 267-273.
- Soler Crespo, P., Pezzi, G. H., & de Mateo Ontañón, S. 1999. Vigilancia de *Escherichia coli* O157 en España. *Boletín Epidemiológico Semanal: Vigilancia Epidemiológica*, 7(10): 105-106.
- Spano, L. C., Sadovsky, A. D. I., Seguí, P. N., Saick, K. W., Kitagawa, S. M., Pereira, F. E., Fagundes-Neto, U., & Scaletsky, I. C. 2008. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, 57(3): 359-363.
- Stanford, K., Hannon, S., Booker, C. W., & Jim, G. K. 2014a. Variable efficacy of a vaccine and direct-fed microbial for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides of feedlot cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(5): 379-387.
- Stanford, K., Bach, S., Baah, J., & McAllister, T. 2014b. A mixture of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, and *Paenibacillus polymyxa* reduces *Escherichia coli* O157:H7 in finishing feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 77(5): 738-744.
- Staples, M., Jennison, A. V., Graham, R. M., & Smith, H. V. 2012. Evaluation of the Meridian Premier EHEC assay as an indicator of Shiga toxin presence in direct faecal specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(4): 322-325.
- Stefan, A., Scaramagli, S., Bergami, R., Mazzini, C., Barbanera, M., Perelle, S., & Fach, P. 2007. Real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay methods for detecting Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in mincemeat samples. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(3): 337-342.
- Stephan, R., Ragettli, S., & Untermann, F. 2000. Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2): 335-341.
- Stephan, R., & Schumacher, S. 2001. Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. *Letters in Applied Microbiology*, 32(2): 114-117.
- Stephan, R., Schumacher, S., Corti, S., Krause, G., Danuser, J., & Beutin, L. 2008. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk chesse collected at producer level. *Journal of Dairy Science*, 91: 2561-2565.
- Strachan N. J. C., Dunn, G. M., Locking, M. E., Reid, T. M. S., & Ogden, L. D. 2006. *Escherichia coli* O157: Burger bug or environmental pathogen?. *International Journal of Food Microbiology*. 112: 129-137.
- Swerdlow, D. L., Woodruff, B. A., Brady, R. C., Griffin, P. M., Tippet, S., Donnell, H. D., Geldreich, E., Payne, B. J., Meyer, A., Wells, J. G., Greene, K. D., Bright, M., Bean, N. H., & Blake, P. A. 1992. A waterborne outbreak in missouri of *Escherichia coli* O157-H7 associated with bloody diarrhea and death. *Annals of Internal Medicine*, 117(10): 812-819.
- Tamplin, M. L. 2002. Growth of *Escherichia coli* O157: H7 in raw ground beef stored at 10 C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. *Journal of Food Protection*, 65(10): 1535-1540.
- Tamplin, M. L., Paoli, G., Marmer, B. S., & Phillips, J. 2005. Models of the behavior of *Escherichia coli* O157: H7 in raw sterile ground beef stored at 5 to 46 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1): 335-344.
- Tarr, C. L. & Whittam, T. S. 2002. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184(2): 479-487.
- Tarr, P. I., Besser, T. E., Hancock, D. D., Keene, W. E., & Goldoft, M. 1997. Verotoxigenic *Escherichia coli* infection: US overview. *Journal of Food Protection*, 60(11): 1466-1471.
- Tarr, P. I., Gordon, C. A., & Chandler, W. L. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 365(9464): 1073-1086.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3): 207-217.
- Thirapanmethee, K. 2012. Extended Spectrum β -Lactamases: Critical Tools of Bacterial Resistance. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*, 39(1): 1-8.
- Thomas, A., Cheasty, T., Frost, J. A., Chart, H., Smith, H. R., & Rowe, B. 1996. Vero cytotoxin-producing

- Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in England and Wales: 1992-4. *Epidemiology and Infection*, 117(01): 1-10.
- Timm, C. D., Irino, K., Gomes, T. A. T., Vieira, M. M., Guth, B. E. C., Vaz, T. M. I., Moreira, C. N., & Aleixo, J. A. G. 2007. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 44(4): 419-425.
- Tobe, T., Hayashi, T., Han, C. G., Schoolnik, G. K., Ohtsubo, E., & Sasakawa, C. 1999. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infection and Immunity*, 67(10): 5455-5462.
- Toledo, M. R. F., Alvariza, M. D. B., Murahovschi, J., Ramos, S., & Trabulsi, L. R. 1983. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infection and Immunity*, 39(2): 586-589.
- Tornieporth, N. G., John, J., Salgado, K., de Jesus, P. A. U. L. O., Latham, E., Melo, M. C., Gunzburg, S. T., & Riley, L. W. 1995. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5): 1371-1374.
- Torpdahl, M., Nielsen, E. M., Scheutz, F., Olesen, B., Hansen, D. S., & Hasman, H. 2013. Detection of a Shiga toxin-and extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* O157:H7 human clinical isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68: 1203-1204.
- Tóth, I., Héroult, F., Beutin, L., & Oswald, E. 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9): 4285-4291.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiappello, H., Clermont, O., *et al.* 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet*, 5(1): e1000344.
- Trabulsi, L. R., Keller, R., & Tardelli Gomes, T. A. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 8(5): 508-513.
- Trotz-Williams, L. A., Mercer, N. J., Walters, J. M., Maki, A. M., & Johnson, R. P. 2012. Pork Implicated in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Ontario, Canada. *Canadian Journal of Public Health-Revue Canadienne De Sante Publique*, 103(5): E322-E326.
- Tuttle, J., Gómez, T., Doyle, M. P., Wells, J. G., Zhao, T., Tauxe, R. V., & Griffin, P. M. 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology and Infection*, 122(2): 185-192.
- Tyrrel, S. F., Knox, J. W., & Weatherhead, E. K. 2006. Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*, 69(8): 2029-2035.
- Uhtil, S., Jaksic, S., Petrak, T., & Botka-Petrak, K. 2001. Presence of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and ground baby beef meat. *Journal of Food Protection*, 64(6): 862-864.
- UNICEF/OMS, United Nations International Children's Emergency Fund/Organizacion Mundial de la Salud. 2009. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done: 68.
- Upton, P. & Coia, J. E. 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurized milk supply. *Lancet*, 344(8928): 1015-1015.
- USDA, United States Department of Agriculture. 2011a. Detection and isolation of non-O157 shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains (STEC) from meat products. In: Laboratory QA/QC Division (ed), Laboratory Guidebook. US Department of Agriculture, Laboratory QA/QC Division: Athens, GA, pp. 1-16.
- USDA, United States Department of Agriculture. 2011b. Food Safety and Inspection Service. DRAFT Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC): 1-35.
- Valat, C., Haenni, M., Saras, E., Auvray, F., Forest, K., Oswald, E., & Madec, J. Y. 2012. CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate of serotype O111:H8. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4): 1308-1309.
- Valcour, J. E., Michel, P., McEwen, S. A., & Wilson, J. B. 2002. Associations between indicators of livestock farming intensity and incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Emerging Infectious Diseases*, 8(3): 252-257.
- Valentin, L., Sharo, H., Hille, K., Seibt, U., Fischer, J., Pfeifer, Y., Brenner Michael, G., Nickel, S., Schimiedel, J., Falgenhauer, L., Friese, A., Bauerfeind, R., Roesler, U., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Helmuth, R., Valenza, G., Werner, G., Schwarz, S., Guerra, B., Appel, B., Krienbrock, L., Kasbohrer, A. 2014. Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7): 805-816.
- Vally, H., Hall, G., Dyda, A., Raupach, J., Knope, K., Combs, B., & Desmarchelier, P. 2012. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Australia, 2000-2010. *BMC Public Health*, 12(1): 63.
- Van den Broeck, W., Cox, E., & Goddeeris, B. M. 1999. Seroprevalence of F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in regions with different pig farm densities. *Veterinary Microbiology*, 69(3): 207-216.
- Van Derlinden, E., Bernaerts, K., & Van Impe, J. F. 2008. Dynamics of *Escherichia coli* at elevated temperatures: effect of temperature history and medium. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2): 438-453.

- Vernozy-Rozand, C., Montet, M. P., Berardin, M., Bavai, C., & Beutin, L. 2005. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Letters in Applied Microbiology*, 41(3): 235-241.
- Vieira, M. A., Andrade, J. R., Trabuñs, L. R., Rosa, A. C., Dias, A. M., Ramos, S. R., Frankel, G., & Gomes, T. A. 2001. Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Escherichia coli* Strains of Non-Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Serogroups that Carry *eae* and Lack the EPEC Adherence Factor and Shiga Toxin DNA Probe Sequences. *Journal of Infectious Diseases*, 183(5): 762-772.
- Vilchez, S., Reyes, D., Paniagua, M., Bucardo, F., Möllby, R., & Weintraub, A. 2009. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *Journal of Medical Microbiology*, 58(5): 630-637.
- Viljanen, M. K., Peltola, T., Junnila, S. Y. T., Olkkonen, L., Jarvinen, H., Kuistila, M., & Huovinen, P. 1990. Outbreak of diarrhea due to *Escherichia coli* O111-B4 in schoolchildren and adults -association of vi antigen-like reactivity. *Lancet*, 336(8719): 831-834.
- Vincent, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dozois, C. M., Dutil, L., Galanakis, C., Reid-Smith, R. J., Tellier, P.-P., Tellis, P. A., Ziebell, K., & Manges, A. R. 2010. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging infectious diseases*, 16(1): 88-95.
- Vojdani, J. D., Beuchat, L. R., & Tauxe, R. V. 2008. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71(2): 356-364.
- Vrbova, L., Johnson, K., Whitfield, Y., & Middleton, D. 2012. A descriptive study of reportable gastrointestinal illnesses in Ontario, Canada, from 2007 to 2009. *BMC Public Health*, 12(1): 970.
- Vredenburg, J., Varela, A. R., Hasan, B., Bertilsson, S., Olsen, B., Narciso-da-Rocha, C., Bonnedahl, J., Stedt, J., Da Costa, P. M., & Manaia, C. M. 2014. Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from birds of prey in Portugal are genetically distinct from those isolated from water environments and gulls in Portugal, Spain and Sweden. *Environmental Microbiology*, 16(4): 995-1004.
- Vu Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Dahbi, G., López, C., González, E. A., & Blanco, J. 2006. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. *BMC Veterinary Research*, 2: 10-10.
- Vu-Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J. E., Dahbi, G., Mora, A., López, C., González, E. A., & Blanco, J. 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Veterinary Journal*, 174(1): 176-187.
- Wahl, E., Vold, L., Lindstedt, B. A., Bruheim, T., & Afset, J. E. 2011. Investigation of an *Escherichia coli* O145 outbreak in a child day-care centre-extensive sampling and characterization of *eae*-and *stx* 1-positive *E. coli* yields epidemiological and socioeconomic insight. *BMC Infectious Diseases*, 11(1): 238.
- Walker, C. L. F., Rudan, I., Liu, L., Nair, H., Theodoratou, E., Bhutta, Z. A., O'Brien, K. L., Campbell, H., & Black, R. E. 2013. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *The Lancet*, 381(9875): 1405-1416.
- Wallace, J. S., Cheasty, T., & Jones, K. 1997. Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *Journal of Applied Microbiology*, 82(3): 399-404.
- Walterspiel, J. N., Ashkenazi, S., Morrow, A. L., & Cleary, T. G. 1992. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin-I. *Infection*, 20(1): 25-29.
- Wang, S., Zhang, S., Liu, Z., Liu, P., Shi, Z., Wei, J., Shao, D., Li, B., & Ma, Z. 2014. Molecular characterization of enterohemorrhagic *E. coli* O157 isolated from animal fecal and food samples in Eastern China. *The Scientific World Journal*, 2014: 946394-946394.
- Warren, R. E., Ensor, V. M., O'Neill, P., Butler, V., Taylor, J., Nye, K., Harvey, M., Livermore, D. M., Woodford, N., & Hawkey, P. M. 2008. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3): 504-508.
- Warshawsky, B., Gutmanis, I., Henry, B., Dow, J., Reffle, J., Pollett, G., Ahmed, R., Aldom, J., Alves, D., Chagla, A., Ciebin, B., Kolbe, F., Jamieson, F., & Rodgers, F. 2002. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 related to animal contact at a petting zoo. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, 13(3): 175.
- Waters J. R., Sharp J. C. M., Dev, V. J. 1994. Infection caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta, Canada and in Scotland: a fiveyear review, 1987-1991. *Clinical Infectious Diseases*, 19: 834-843.
- Weissman, S. J., Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Billig, M., Dykhuizen, D., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Cookson, B. T., Fang, F. C., Scholes, D., Chattopadhyay, S., & Sokurenko, E. 2012. High-Resolution Two-Locus Clonal Typing of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5): 1353-1360.
- Wells, J. E., Shackelford, S. D., Berry, E. D., Kalchayanand, N., Guerini, M. N., Varel, V. H., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Freetly, H. C., Wheeler, T. L., Ferrill, C. L., & Koohmaraie, M. 2009. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides of feedlot steers fed diets with or without wet distiller grains with soluble. *Journal of Food Protection*, 72: 1624-1633.
- Wendel, A. M., Johnson, D. H., Sharapov, U., Grant, J., Archer, J. R., Monson, T., Koschmann, C., & Davis, J. P. 2009. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: The Wisconsin Investigation. *Clinical Infectious Diseases*, 48(8): 1079-1086.

- Willshaw, G. A., Cheasty, T., Frost, J., Threlfall, E., & Rowe, B. 1996. Antimicrobial resistance of O157 VTEC in England and Wales. *EVC News*, 5: 3-4.
- Willshaw, G. A., Cheasty, T., Smith, H. R., O'Brien, S. J., & Adak, G. K. 2001. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 and other VTEC from human infections in England and Wales: 1995-1998. *Journal of Medical Microbiology*, 50(2): 135-142.
- Willshaw, G. A., Evans, J., Cheasty, T., Cummins, A., & Pritchard, G. C. 2003. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection and private farm visits. *Veterinary Record*. 152: 365-366.
- Wittum, T. E., Mollenkopf, D. F., Daniels, J. B., Parkinson, A. E., Mathews, J. L., Fry, P. R., Abley, M. J., & Gebreyes, W. A. 2010. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United States. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(12): 1575-1579.
- Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L., & Tarr, P. I. 2000. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *New England Journal of Medicine*, 342(26): 1930-1936.
- Wood, L. V., Ferguson, L. E., Hogan, P., Thurman, D., Morgan, D. R., DuPont, H. L., & Ericsson, C. D. 1983. Incidence of bacterial enteropathogens in foods from Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(2): 328-332.
- Xia, X., Meng, J., McDermott, P. F., & Zhao, S. 2011a. *Escherichia coli* from retail meats carry genes associated with uropathogenic *Escherichia coli*, but are weakly invasive in human bladder cell culture. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 1166-1176.
- Xia, X., Meng, J., Zhao, S., Bodeis-Jones, S.A., Gaines, S.A., Ayers, S.L., McDermott, P. F. 2011b. Identification and antimicrobial resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail meats. *Journal of Food Protection*, 74(1):38-44.
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(2): 85-90.
- Yamasaki, S. & Takeda, Y. 1997. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 episode in Japan with a perspective on vero toxins (Shiga-like toxins). *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, 16(4): 229-240.
- Yang, J., Nie, H., Chen, L., Zhang, X., Yang, F., Xu, X., Zhu, Y., Yu, J., & Jin, Q. 2007. Revisiting the molecular evolutionary history of *Shigella spp.* *Journal of Molecular Evolution*, 64(1): 71-79.
- Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K. I., & Enomoto, K. 2002. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1): 294-297.
- Yatsuyanagi, J., Saito, S., Miyajima, Y., Amano, K. I., & Enomoto, K. 2003. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the astA gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5): 2033-2039.
- Yoder, J. S., Cesario, S., Plotkin, V., Ma, X., Shannon, K. K., & Dworkin, M. S. 2006. Outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection with an unusually long duration of illness. *Clinical Infectious Diseases*, 42(11): 1513-1517.
- Yuste, M., De La Fuente, R., Ruiz-santa-quiteria, J. A., Cid, D., & Orden, J. A. 2006. Detection of the astA (EAST1) gene in attaching and effacing *Escherichia coli* from ruminants. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(2): 75-77.
- Zhang, W. L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., & Schmidt, H. 2002. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12): 4486-4492.
- Zhang, X. P., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K., & Acheson, D. W. K. 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 181(2): 664-670.
- Zhao, C., Ge, B., De Villena, J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D. G., Warner, D., & Meng, J. 2001. Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, DC, area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12): 5431-5436.
- Zhao, T., Doyle, M. P., & Besser, R. E. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8): 2526-2530.
- Zhao, T. & Doyle, M. P. 1994. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *Journal of Food Protection*, 57(9): 780-783.
- Zhao, T., Doyle M.p., Fedorka-Cray P.J., Zhao P., Ladely S. 2002. Occurrence of *Salmonella* enterica serotype typhimurium DT104A in retail beef. *Journal of Food Prot*, 65(2):403-7.
- Zhou, Z. J., Nishikawa, Y., Zhu, P., Hong, S., Hase, A., Cheasty, T., Smith, H. R., Zheng, M. G., & Haruki, K. 2002. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef, pork and cattle fecal samples in Changchun, China. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(11): 1041-1044.
- Ziese, T., Anderson, Y., De Jong, B., Lofdahl, S., & Ramberg, M. 1996. Outbreak of *Escherichia coli* O157 in Sweden. *Euro Surveillance: Bulletin European sur les Maladies Transmissibles= European Communicable Disease Bulletin*, 1(1): 2-3.
- Zurfluh, K., Nüesch-Inderbinnen, M., Morach, M., Berner, A. Z., Hächler, H., & Stephan, R. 2015. Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae

Isolated from Vegetables Imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9): 3115-3120.

Zweifel, C., Giezendanner, N., Corti, S., Krause, G., Beutin, L., Danuser, J., Stephan, R. 2010. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Swiss raw milk chesse within a 3-year monitoring program. *Journal of Food Protection*. 73, 88-91.



6.2. Bibliografía Online

- AESAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/otras_actividades/UIIMP_seg_alimentaria_nutricion/Maria_Luisa_Garcia_Lopez.pdf.
- AFNOR, Association Française de Normalisation. Certificado N° 3M 01/806/01. <http://www.afnor.org>. http://solutions.3mindia.co.in/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en_IN&lmd=1260273581000&assetId=1258558690207&assetType=MMM_Image&blobAttribute=ImageFile.
- Archer, J. Epidemiologist, Wisconsin Division of Public Health, Bureau of Communicable Diseases and Preparedness, Communicable Disease Epidemiology Section. Personal communication. Wisconsin Department of Health Services. <http://dhfs.wisconsin.gov/communicable/comunicable/contactcs.htm>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html#pfge>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library (PHIL). <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. Update on multi-state outbreak of *E. coli* O157:H7 infections from fresh spinach. 2006. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2007a. Investigation of Outbreak of Human Infections Caused by *E. coli* O157:H7. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Totino's and Jeni's Frozen Pizza (Final update) Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2007/jeno-pizza-11-1-2007.html>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2007b. Multistate Outbreak of *E. coli* O157 Infections Linked to Topp's Brand Ground Beef Patties. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2007/ground-beef-patties-10-26-2007.html>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2008. Investigation of Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Ground Beef from Kroger/Nebraska Ltd. (Final update) Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2008/ground-beef-kroger-7-18-2008.html>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2009a. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Beef from Fairbank Farms. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2009/>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2009b. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Eating Raw Refrigerated, Prepackaged Cookie Dough. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2009/0630.html>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2009c. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Beef from JBS Swift Beef Company. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2009/0701.html>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2010a. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Beef from National Steak and Poultry. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2010/>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2010b. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *E. coli* O145 Infections Linked to Shredded Romaine Lettuce from a Single Processing Facility. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2010c. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Cheese. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2010/cheese0157/index.html>.

-
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2010d. Timeline of infections: Multistate outbreak of *E. coli* O145 infections associated with romaine lettuce -United States 2010. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html?s_cid=ccu051010_006.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2011a. Investigation Announcement: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Lebanon Bologna. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. http://www.cdc.gov/ecoli/2011/O157_0311/index.html.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with In-shell Hazelnuts. 2011b. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/hazelnuts0157/index.html>.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. Investigation Update: Outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* O104 (STEC O104:H4) infections associated with travel to Germany. 2011c. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecolio104/>.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2012a. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/032312/index.html>.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2012b. Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Organic Spinach and Spring Mix Blend (Final Update). Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O157H7-11-12/index.html>.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2012c. Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O26 Infections Linked to Raw Clover Sprouts at Jimmy John's Restaurants (Final Update). Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O26-02-12/index.html>.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2013a. Foodborne Outbreak Online Database (FOOD). <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2013b. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ready-to-Eat Salads (Final Update). Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html>.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2013c. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121 Infections Linked to Farm Rich Brand Frozen Food Products (Final Update). Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2013/O121-03-13/index.html>.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2014a. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ground Beef (Final Update). Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O157H7-05-14/>.
 - CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2014b. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121 Infections Linked to Raw Clover Sprouts (Final Update). Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O121-05-14/index.html>.
 - EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System. <http://ecdc.europa.eu/en/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>.
 - ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. <http://ecdc.europa.eu>.
 - ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. 2011. http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvicelayouts/forms/Review_DispForm.aspx?List=a3216f4c-f040-4f51-9f77-a96046dbfd72&ID=602.
 - EFSA, European Food Safety Authority. <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/3138.pdf>.
 - Fairbrother, J. M. 2015. E coli asociada a diarrea post-destete. Etiología, signos clínicos y factores de riesgo. http://www.3tres3.com/diarreas-post-destete/diarrea-postdestete-por-e-coli-etilogia-signos-clinicos-y-riesgo_34786/.
 - FDA, U. S. Food and Drug Administration. Whole Genome Sequencing (WGS) Program. 2015. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceReseach/WholeGenomeSequencingProgramWGS/>.
-

- Frankel Gad, Imperial College London. <http://www.imperial.ac.uk/people/g.frankel/research.html>.
- ISO, International Standard Organization. ISO 16649-2 *E. coli* method. http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=29824.
- ISS, Istituto Superiore di Sanità. http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_03_Rev_1.pdf.
- ISS, Istituto Superiore di Sanità. http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_01_Rev_0.pdf.
- ISS, Istituto Superiore di Sanità. http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_06_Rev_1.pdf.
- ISS, Istituto Superiore di Sanità. http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_05_Rev_1.pdf.
- Lahey Clinic. β -lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. <http://www.lahey.org/Studies>.
- Life Technologies. <http://www.lifetechnologies.com>.
- Statens Serum Institut. <http://www.ssi.dk/English/HealthdataandICT/National%20Reference%20Laboratories/Bacteria.aspx>.
- The University of Warwick. Warwick Medical School. MLST Databases at UoW. <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi.html>.
- USDA, United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. <http://www.ars.usda.gov/is/graphics/photos/mar05/K11077-1.htm>.

6.3. Legislación

- Directiva 97/78/CE del Consejo de 18 de diciembre de 1997 por la que se establecen los principios relativos a la organización de controles veterinarios de los productos que se introduzcan en la Comunidad procedentes de países terceros. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 024 p. 32 de 30 de enero de 1998.
- Decisión 2119/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 24 de septiembre de 1998 por la que se crea una red de vigilancia epidemiológica y de control de las enfermedades transmisibles en la Comunidad. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 168 p. 1 de 30.10.1998.
- Decisión 2009/312/CE. Decisión de la Comisión de 2 de abril de 2009 que modifica la Decisión 2000/96/CE en lo relativo a las redes especializadas de vigilancia de las enfermedades transmisibles. Diario Oficial de la Unión Europea, L 91 p. 27 de 3.4.2009.
- IM/04/2014, Instrucción interna del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 2014. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC). Subdirección General de Sanidad Exterior, p. 6.
- Reglamento (CE) Nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Diario Oficial de la Unión Europea, L 31 p. 24 de 1.2.2002.
- Reglamento (CE) Nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 131 p. 1 de 30.4.2004.
- Reglamento (CE) Nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea L 139 p. 55 de 30.4.2004.
- Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 338 p. 1 de 22.12.2005.

- Reglamento (CE) Nº 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 322 p. 12 de 7.12.2007.
- Reglamento (UE) Nº 231/2012 de la Comisión de 9 de marzo de 2012 por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, L 83 p. 295 de 22.3.2012.
- Reglamento (UE) Nº 101/2013 de la Comisión de 4 de febrero de 2013 relativo a la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de superficie de las canales de bovinos. Diario Oficial de la Unión Europea, L 34 p. 3 de 5.2.2013.
- Reglamento de Ejecución (UE) Nº 208/2013 de la Comisión de 11 de marzo de 2013 sobre requisitos en materia de trazabilidad de los brotes y de las semillas destinadas a la producción de brotes. Diario Oficial de la Unión Europea, L 68 p. 16 de 12.3.2013.
- Reglamento (UE) Nº 209/2013 de la Comisión de 11 de marzo de 2013 que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 en lo que respecta a los criterios microbiológicos para los brotes y las normas de muestreo para las canales de aves de corral y la carne fresca de aves de corral. Diario Oficial de la Unión Europea, L 68 p. 19 de 12.3.2013.
- Reglamento (UE) Nº 210/2013 de la Comisión de 11 de marzo de 2013 sobre la autorización de los establecimientos que producen brotes en virtud del Reglamento (CE) Nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, L 68 p. 24 de 12.3.2013.
- Reglamento (UE) Nº 211/2013 de la Comisión de 11 de marzo de 2013 relativo a los requisitos de certificación aplicables a las importaciones en la Unión de brotes y semillas destinadas a la producción de brotes. Diario Oficial de la Unión Europea, L 68 p. 26 de 12.3.2013.
- Working document DRAFT. European Commission. Health and consumers Directorate-General. Guidance document on the application of article 14 of Regulation (EC) Nº 178/2002 as regards food contaminated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC).

