



universidad  
de león

TESIS DOCTORAL



**INCIDENCIA Y CONTROL DE TIPOS  
PATÓGENOS DE *Escherichia coli*  
(STEC Y EPEC) EN LECHE DE VACA Y  
QUESOS DERIVADOS EN CASTILLA Y  
LEÓN**

Edson Antonio Rios

Programa de Doctorado:

CIENCIAS VETERINARIAS Y DE LOS ALIMENTOS

FACULTAD DE VETERINARIA

Directores:

D. Jose María Rodríguez Calleja

D. Andrés Otero Carballeira

León, 2018





universidad  
de león

## CONFORMIDAD DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Los doctores **D. Jose María Rodríguez Calleja** y **D. Andrés Otero Carballeira**, adscritos al Área de Conocimiento de Nutrición y Bromatología del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, como directores de la Tesis Doctoral titulada “Incidencia y control de tipos patógenos de *E. coli* (STEC y EPEC) en leche de vaca y quesos derivados en Castilla y León” realizada por **D. Edson A. Rios** en el programa de doctorado “CIENCIAS VETERINARIAS Y DE LOS ALIMENTOS”, informan favorablemente el depósito de la misma dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En León a 22 de enero de 2018.

Fdo. Jose María Rodríguez Calleja

Fdo. Andrés Otero Carballeira



## **FINANCIACIÓN**

Se agradece al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) por la financiación prestada al doctorando mediante una beca que cubrió todo el período de desarrollo de la Tesis Doctoral.

Los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral fueron también financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2011 – 26118) y por la Universidad de León (Programa de ayuda a proyectos de investigación).



## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, a mis directores Drs. José María Rodríguez Calleja y Andrés Otero Carballeira que me apoyaron en todo el camino del desarrollo de la tesis, sin ellos nada hubiera sido posible.

A todo el personal del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos que me ayudaron en la elaboración de la tesis, especialmente al Dr. Jesús Ángel Santos Buelga. A Aurelia y Rosa que siempre estuvieron presentes en los momentos de necesidad, siendo capaces de resolver todo.

A las empresas, Cooperativa Vega-Esla y Lactiber, y a los responsables de las explotaciones ganaderas por su inestimable colaboración y plena disponibilidad.

Al LREC (Lugo), especialmente a Jorge Blanco, por la realización de las pruebas de serotipado de las cepas.

A Juliana por todo el apoyo durante nuestra estancia en España, tanto en la vida profesional como en la personal, con su compañerismo todo fue más fácil. A mi amiga Sandra que en todos los momentos estaba dispuesta a ayudar.

A mi familia (Clotilde, Ademir, Herminia y Danilo), aún que distantes me proporcionaron todo el apoyo emocional necesario para que yo pudiera concluir esta etapa de mi vida.

A mis amigos, Dra. Vanerli Beloti (Neli) y Dr. Felipe Nael Seixas, que creyeron en mí y fueron principales responsables de que empezara el doctorado.



“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE ACRÓNIMOS .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
1.IMPORTANCIA GENERAL DE LA LECHE DE VACA .....	9
2.IMPORTANCIA GENERAL DEL QUESO A BASE DE LECHE DE VACA .....	14
3. <i>E. COLI</i> DIARREAGÉNICOS.....	18
4.EL GRUPO PATÓGENO <i>E. COLI</i> PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC).....	22
5.EL PATOTIPO <i>E. COLI</i> ENTEROPATÓGENICO (EPEC) .....	25
6.TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE STEC Y EPEC .....	27
7.PANORAMA GENERAL DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN <i>E. COLI</i> .....	34
8.CONTROL MICROBIOLÓGICO MEDIANTE PROCESOS COMBINADOS NO TERMICOS EN ALIMENTOS .....	38
9.OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL .....	46
10.BIBLIOGRAFÍA .....	47
<b>CAPÍTULO I: INCIDENCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC) Y <i>E. COLI</i> ENTEROPATOGÉNICO (EPEC) EN MUESTRAS DE LECHE, QUESO DE VACA Y EL AMBIENTE DE EXPLOTACIONES DEL NOROESTE DE CASTILLA Y LEÓN.....</b>	<b>57</b>
1.INTRODUCCIÓN.....	59
2.MATERIAL Y MÉTODOS .....	61
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	68
4.HALLAZGOS MÁS RELEVANTES .....	76
5.BIBLIOGRAFÍA.....	77
<b>CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN Y RELACIONES GENÉTICAS DE CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) AISLADAS DE LECHE DE VACA Y DEL AMBIENTE DE LAS EXPLOTACIONES. ....</b>	<b>83</b>
1.INTRODUCCIÓN.....	85
2.MATERIAL Y MÉTODOS .....	88
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	103
4.HALLAZGOS MÁS RELEVANTES .....	117
5.BIBLIOGRAFÍA .....	118
<b>CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DE CEPAS Y RELACIONES GENÉTICAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROPATOGÉNICO (EPEC) AISLADAS DE LECHE DE VACA Y DEL AMBIENTE DE LAS EXPLOTACIONES.....</b>	<b>127</b>
1.INTRODUCCIÓN.....	129
2.MATERIAL Y MÉTODOS .....	131
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	135
4.HALLAZGOS MÁS RELEVANTES .....	147
5.BIBLIOGRAFÍA.....	148

<b>CAPÍTULO IV: COMPORTAMIENTO DE CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) Y ENTEROPATOGÉNICAS ATÍPICAS (aEPEC) FRENTE A DIFERENTES AGENTES DE ESTRÉS (ÁCIDO, PH Y ACEITES ESENCIALES).....</b>	<b>155</b>
1.INTRODUCCIÓN.....	157
2.MATERIAL Y MÉTODOS .....	159
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	167
4.HALLAZGOS MÁS RELEVANTES .....	175
5.BIBLIOGRAFÍA.....	176
<b>CAPÍTULO V: COMPORTAMIENTO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC) Y ENTEROPATOGÉNICO ATÍPICO (aEPEC) DURANTE LA FABRICACIÓN, LA MADURACIÓN Y EL ALMACENAMIENTO DE QUESO ELABORADO CON LECHE CRUDA DE VACA. ....</b>	<b>179</b>
1.INTRODUCCIÓN.....	181
2.MATERIAL Y MÉTODOS .....	183
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	189
4.HALLAZGOS MÁS RELEVANTES .....	196
5.BIBLIOGRAFÍA.....	197
<b>CAPÍTULO VI: CONTROL DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC) Y ENTEROPATÓGENICO ATÍPICO (aEPEC) EN QUESO MADURADO MEDIANTE TRATAMIENTOS COMBINADOS DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS, ENVASADO ACTIVO ANTIMICROBIANO (TOMILLO) Y REFRIGERACIÓN. ....</b>	<b>201</b>
1.INTRODUCCIÓN .....	203
2.MATERIAL Y MÉTODOS .....	205
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	211
4.HALLAZGOS MÁS RELEVANTES .....	221
5.BIBLIOGRAFÍA.....	222
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>227</b>

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>ETEC</b>	<i>E. coli</i> enterotoxigénico
<b>AE</b>	Aceite esencial	<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>A/E</b>	Adhesión y borrado	<b>IMS</b>	<i>Separación inmunomagnética</i>
<b>aEPEC</b>	<i>E. coli</i> enteropatógeno atípico	<b>LEE</b>	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
<b>AIEC</b>	<i>E. coli</i> adherenteinvasivo	<b>LIA</b>	<i>Lysine iron agar</i>
<b>APH</b>	Altas presiones hidrostática	<b>LREC</b>	Laboratorio Nacional de Referencia para Detección de <i>E. coli</i> en alimentos
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza	<b>LTI</b>	Laboratorio de Técnicas Instrumentales
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>MDR</b>	<i>Multidrug-resistant</i>
<b>a<sub>w</sub></b>	Actividad de agua	<b>MH</b>	<i>Mueller Hilton</i>
<b>BAL</b>	Bacterias ácido-lácticas	<b>MIO</b>	<i>Motility indole ornithine</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain heart infusion</i>	<b>MLST</b>	<i>Multilocus sequence typing</i>
<b>BLEE</b>	Productoras de β-lactamasas de espectro extendido	<b>MRS</b>	<i>Man, Rogosa and Sharpe</i>
<b>CH</b>	Colitis hemorrágica	<b>MR-VP</b>	<i>Methyl red Voges Proskaver</i>
<b>CLB</b>	<i>Cell lysis buffer</i>	<b>mTSB</b>	<i>Modified tryptone soya broth</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>CMB</b>	Concentración mínima bactericida	<b>NJ</b>	Neighbor-Joining
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibidora	<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>CSB</b>	<i>Cell suspension buffer</i>	<b>PCA</b>	<i>Plate count agar</i>
<b>CT-SMAC</b>	Sorbitol MacConkey suplementado con cefixima-telurito	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>DAEC</b>	<i>E. coli</i> difusoaderente	<b>PDR</b>	<i>Pandrug-resistant</i>
<b>DEC</b>	<i>E. coli</i> diarreagénicos	<b>pEAF</b>	Plásmido del factor de adherencia
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido	<b>PFGE</b>	Electroforesis en gel de campo pulsado
<b>EAEC</b>	<i>E. coli</i> enteroagregativo	<b>qPCR</b>	PCR en tiempo real
<b>EC</b>	Caldo de <i>E. coli</i>	<b>SIM</b>	<i>Sulfide indole motility</i>
<b>EE.UU.</b>	Estados Unidos	<b>SMAC</b>	Sorbitol MacConkey
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>	<b>ST</b>	<i>Sequence type</i>
<b>EHEC</b>	<i>E. coli</i> enterohemorrágico	<b>STEC</b>	<i>E. coli</i> productor de toxina Shiga
<b>EIEC</b>	<i>E. coli</i> enteroinvasivo		
<b>EPEC</b>	<i>E. coli</i> enteropatógeno		

<b>Stx1</b>	Shiga toxina 1	<b>TP</b>	<i>Tryptone phosphate</i>
<b>Stx2</b>	Shiga toxina 2	<b>TSA-YE</b>	<i>Tryptone soya agar con 0,6% de yeast extract</i>
<b>SUH</b>	Síndrome urémico hemolítica	<b>TSB</b>	<i>Tryptone soy broth</i>
<b>TAE</b>	Tris-Acetic-EDTA	<b>TSB-YE</b>	<i>Tryptone soya broth con 0,6% de yeast extract</i>
<b>TALm</b>	<i>Thin agar layer</i> con modificaciones	<b>TSI</b>	<i>Triple sugar iron agar</i>
<b>TBE</b>	<i>Tris-Borate EDTA buffer</i>	<b>UE</b>	Unión Europea
<b>TBX</b>	<i>Tryptone bile X-glucuronide</i>	<b>XDR</b>	<i>Extensively drug-resistant</i>
<b>tEPEC</b>	<i>E. coli</i> enteropatógeno típico		
<b>TO</b>	Tomillo		

## RESUMEN

Esta Tesis Doctoral fue planteada a fin de determinar la importancia de *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) y *E. coli* enteropatógeno (EPEC) en leche de vaca y queso madurado de leche cruda de vaca, así como de sus principales rutas de contaminación en las granjas de vacuno lechero. Además, se investigó el comportamiento de cepas de estos grupos patógenos en el proceso de elaboración y maduración de quesos obtenidos a partir de leche cruda de vaca. Finalmente, fue estudiado un método no térmico basado en envasado activo antimicrobiano y altas presiones hidrostáticas para el control de cepas STEC y EPEC en queso madurado.

Los resultados obtenidos indican que la leche cruda de vaca de Castilla y León es un importante vehículo de STEC no-O157 y EPEC atípicos (aEPEC), alcanzando una incidencia de 2,3% y 6,1%, respectivamente. El principal reservorio de STEC no-O157 y aEPEC en las granjas lecheras son las heces de los animales, aunque los operarios y el aire pueden ser fuentes de contaminación de la leche por STEC. Además, las cepas de estos grupos de *E. coli* aisladas en el hábitat vacuno son portadoras de genes de virulencia, muchas de ellas presentan perfiles de multiresistencia a antibióticos, y algunas de estas cepas están relacionadas con cepas causantes de enfermedades a las personas.

Por otro lado, aunque la incidencia de estos grupos patógenos de *E. coli* fue nula en quesos de leche cruda de vaca madurados, cuando los quesos son elaborados con leche intencionalmente contaminada con STEC no-O157 y aEPEC el proceso convencional de fabricación y la maduración de 90 días no es suficiente para inactivar a estas bacterias. Los tratamientos de envasado activo con extractos de tomillo y altas presiones hidrostáticas son capaces de reducir significativamente las poblaciones de estos grupos patógenos en queso de leche cruda de vaca madurado, con un efecto sinérgico cuando son combinados, mostrándose como una alternativa para garantizar la inocuidad de los quesos elaborados con leche cruda.





**INTRODUCCIÓN GENERAL Y  
OBJETIVOS**

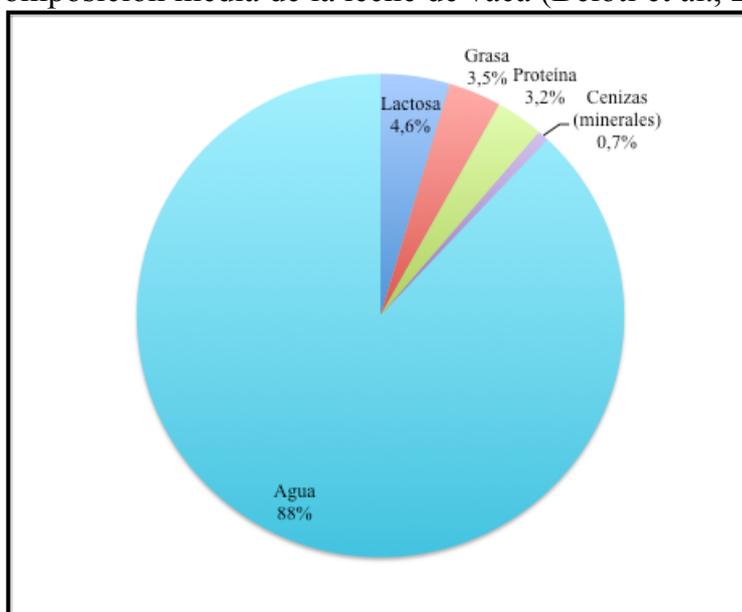




## 1. IMPORTANCIA GENERAL DE LA LECHE DE VACA

La leche es definida en el *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 2011) como la secreción mamaria normal de animales lecheros, obtenida mediante uno o más ordeños, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida. Los componentes nutricionales se encuentran en una dispersión coloidal compleja que contiene glóbulos de grasa, micelas de caseína y proteínas de suero en una solución acuosa de lactosa, minerales y algunos otros compuestos menores como se representa en la Figura 0.1.

**Figura 0.1.** Composición media de la leche de vaca (Beloti et al., 2015).



### 1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA

Segundo datos de la FAO, la producción de leche de vaca ya supera los 650 millones de toneladas (FAO, 2013). Es ampliamente utilizada para el consumo humano en todo el mundo, especialmente por niños y ancianos, y representa un producto de gran importancia para la dieta en muchas partes del mundo. En gran parte de los países europeos, Estados Unidos (EE.UU.), Canadá, Australia y Nueva Zelanda, alrededor del 30% de la proteína dietética es suministrada por leche y sus derivados (McSweeney y Fox, 2013).

En el año de 2013, la leche de vaca fue el quinto producto alimenticio más producido en España en función de la producción total. Se obtuvieron aproximadamente 6,7 millones de toneladas de leche en 2014 (FAOSTAT, 2017), de las que 842.000 toneladas fueron obtenidas en Castilla y León, que ocupa la segunda posición en el ámbito nacional (MAGRAMA, 2014).

### 1.2.CONTAMINACIÓN MICROBIANA

Los niveles de microorganismos en la leche proporcionan información acerca del estado sanitario del animal lechero y de la higiene tanto del ordeño como de las fases posteriores (ICMSF, 2005). Por esa razón, muchos países utilizan los recuentos microbiológicos para la supervisión de los programas de higiene. En España para el control higiénico-sanitario de leche cruda de vaca se utiliza el recuento de gérmenes totales ( $<100.000$  UFC/ml) y de células somáticas (400.000 células/ml) establecido por el Real Decreto 1728/2007 (Real Decreto 1728, 2008)

#### 1.2.1. Contaminación de la ubre

Antes del ordeño, la leche dentro de la ubre de un animal sano es estéril. Sin embargo, su alto contenido de nutrientes, un pH casi neutro y una alta actividad de agua, proporcionan un ambiente ideal para el crecimiento de los microorganismos (Quigley et al., 2013), y posibilita la contaminación durante la obtención de la leche. Por eso, la leche cruda tiene una microbiota mixta derivada de la ubre, de la explotación, de las personas y equipos en contacto con la leche (ICMSF, 2005). Mientras que una ubre en un estado sanitario óptimo contribuirá muy poco a la contaminación de la leche, una vaca que tenga su ubre colonizada por microorganismos (mastitis) produce leche con una contaminación superior a  $10^7$  ufc/ml (Moatsou y Moschopoulou, 2014).

La contaminación de la leche durante el ordeño puede ocurrir cuando la desinfección y limpieza exterior de la ubre sea insuficiente, produciendo que la contaminación de la leche recién ordeñada varíe entre  $<10^2$  a millones de ufc/ml (ICMSF, 2005). La contaminación de mayor importancia se produce a partir de

las heces y los restos de las camas de los animales que pueden contener bacterias patógenas. Con el fin de minimizar la contaminación proveniente de la ubre es crucial la limpieza y desinfección antes de su ordeño (ICMSF, 2005).

### 1.2.2. Ambiente

El agua es una fuente de contaminación, especialmente si no está tratada, conteniendo una microbiota variable. El agua utilizada en el proceso de producción de leche debe ser de calidad potable, libre de patógenos y contaminación fecal (ICMSF, 2005; Moatsou y Moschopoulou, 2014). Aunque el aire no sea una fuente significativa de contaminación, este a través de su movimiento puede transferir partículas de polvo del suelo o heces a la leche cruda.

### 1.2.3. Manipuladores de las explotaciones

Los ganaderos que se ocupan de ordeñar o manipular la leche también pueden ser una fuente de contaminación. Son de suma importancia los procedimientos de higiene de todas las personas involucradas. Especial atención se debe mantener con los ordeñadores enfermos que pueden contribuir a la transmisión de microorganismos patógenos a la leche (Moatsou y Moschopoulou, 2014).

## 1.3. BACTERIAS PATÓGENAS

Las bacterias potencialmente contaminantes de la leche de vaca cruda, así como sus posibles fuentes de contaminación, se presentan en la Tabla 0.1.

**Tabla 0.1.** Bacterias patógenas que pueden estar presentes en la leche cruda de vaca y sus fuentes de contaminación (Claeys et al., 2013).

Bacteria patógena	Fuente de contaminación			
	Acceso directo desde la circulación sanguínea	Mamitis	Heces (antes o después del ordeño) y/o por la piel	Ambiental
<i>Salmonella</i> spp.	<sup>1</sup> (x) ( <i>S. Dublin</i> )	(x)	x	x
<i>Brucella abortus</i>	x	(x)		x
<i>Mycobacterium bovis</i>	x		x	x
<i>Coxiella burnetti</i>	x		x	x
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> <sup>2</sup>	x		x	x
<i>Listeria monocytogenes</i>	x		x	x
<i>E. coli</i> productor de toxina Shiga <sup>3</sup>		x	x	x
<i>Campylobacter coli</i> y <i>C. jejuni</i>			x	x
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	(x)	(x)		
<i>Yersinia</i> <sup>4</sup>		x <sup>5</sup>	x	x
<i>Bacillus cereus</i> <sup>6</sup>				x
<i>Staphylococcus aureus</i> productor de enterotoxina		x		x
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>		x		
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>		x		
<i>Leptospira</i>	x			X (Orina)

<sup>1</sup>Raramente.

<sup>2</sup>Potencialmente zoonótico.

<sup>3</sup>Solo ciertas cepas de *E. coli* transferidas por el ganado contienen una combinación de factores de virulencia que son patógenas para los humanos.

<sup>4</sup>*Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*. Solo los biotipos 1b, 2, 3, 4 y 5 de *Y. enterocolitica* son patógenos para los humanos.

<sup>5</sup>Solo *Y. pseudotuberculosis*.

<sup>6</sup>Las toxinas diarreas de *B. cereus* podrían producirse en leche cruda. *B. cereus* también puede producir toxinas eméticas, pero nunca se encontraron en la leche.

Muchos trabajos han puesto de manifiesto la presencia de diferentes tipos de patógenos en la leche cruda, con niveles de prevalencia que no son de los más altos para *E. coli* productor de toxinas Shiga (Tabla 0.2).

**Tabla 0.2.** Prevalencia de bacterias patógenas en leche cruda de vaca y sus dosis infectantes.

<b>Bacteria patógena</b>	<b>EE.UU.<sup>1</sup></b>	<b>Europa<sup>2</sup></b>	<b>Dosis infectante<sup>1</sup></b>
<i>Salmonella</i> spp.	0-8,9%	0-2,9%	< 10 <sup>3</sup>
<i>Campylobacter jejuni</i> y <i>coli</i>	0-12,3%	0-6%	500
<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga	0-3,8%	0-5,7%	<sup>3</sup> 10
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0-12,6%	2,2-10,2%	0,1 a 10 millón

<sup>1</sup>(Lucey, 2015)

<sup>2</sup>(Claeys et al., 2013)

<sup>3</sup>*Escherichia coli* O157:H7

En los últimos 40 años el consumo de leche cruda fue responsable por un total de 108 brotes en todo el mundo, de los cuales 36 fueron en Europa. Las bacterias más importantes involucradas fueron *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* y *C. coli*, *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) y *Listeria monocytogenes* (Claeys et al., 2013)

## **2. IMPORTANCIA GENERAL DEL QUESO A BASE DE LECHE DE VACA**

Según el Real Decreto 1113/2006 (Real Decreto 1113, 2006) se entiende por queso al producto fresco o madurado, solido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche.

### **2.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA**

La producción mundial de queso es de aproximadamente 19 millones de toneladas por año y viene aumentando un 4% anual en los últimos 30 años. Europa es la mayor productora a nivel mundial con una producción que oscila en 11 millones de toneladas por año (Fox et al., 2017).

En España se produjeron cerca de 465.000 toneladas de queso de las que un 35% fue elaborado con leche de vaca. El queso en Castilla y León tiene un potencial productor de más de 90.000 toneladas, lo que supone alrededor del 20% del total nacional, convirtiéndola en la primera Comunidad productora de España. La elevada producción quesera de esta Comunidad forja un entramado industrial lácteo muy relevante, contando la industria transformadora láctea con 165 empresas, algo más del 10% del total nacional, con 3.137 empleados, lo que representa más de la media nacional. El sector productor y las industrias lácteas regionales ocupan el segundo lugar en cuanto a producción, con una cuota del 16% sobre el total nacional, y el 15% de la facturación final de la industria agroalimentaria regional, solo por detrás del sector cárnico (MAPAMA, 2014).

## 2.2.PROCESO DE ELABORACIÓN

El origen de la producción de queso se sitúa en Oriente Medio durante la Revolución Agrícola hace 8.000 años (Fox et al., 2015), probablemente de forma accidental a partir de la contaminación de la leche con bacterias lácticas.

En la actualidad, el queso se produce en dos fases generales: la primera está centrada en alcanzar la composición y el pH deseados, y la segunda en desarrollar las características físicas y de sabor. La primera fase es controlada por la composición de la leche y por el protocolo de fabricación, particularmente por la producción de ácido por los cultivos iniciadores durante el proceso de fabricación. La segunda fase está interconectada con la primera, pero está más influenciada por la variedad de microorganismos y por sus reacciones enzimáticas y químicas. Este proceso se llama maduración o curado, y dependiendo de la variedad de queso, puede conllevar muchos meses para completarse (Marth y Steele, 2000).

La elaboración de los quesos, desde la transformación de la leche hasta la cuajada, está constituida por tres etapas: acidificación, coagulación y sinéresis o expulsión del suero.

Acidificación: se logra generalmente mediante la producción de ácido láctico a través de la fermentación de la lactosa por bacterias, que son conocidas como bacterias ácido-lácticas (BAL), incluyen los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Wiessla* (Fox et al., 2017). La producción de ácido por los cultivos es esencial para desarrollar la estructura básica, la composición, así como el sabor y la textura del queso.

Coagulación: generalmente la cuajada es obtenida por la coagulación de la caseína por acidificación (aproximadamente a pH 4,6) o mediante la proteólisis utilizando enzimas (cuajo).

Sinéresis: proceso en el que el coágulo se concentra por la eliminación de agua y los constituyentes solubles (Janhøj y Qvist, 2010). La sinéresis concentra la grasa y la caseína de la leche en un factor de 6-12 dependiendo de la variedad de queso elaborado. De acuerdo con el *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 2011), el queso

se puede clasificar según sus características de consistencia y maduración tal y como se presenta en la Tabla 0.3.

**Tabla 0.3.** Denominación del queso según sus características de consistencia y maduración (FAO/WHO, 2011).

<b>Según su consistencia: Término 1</b>		<b>Según las principales características de maduración: Término 2</b>
HSMG%	Denominación	
< 51	Extraduro	Madurado
49-56	Duro	Madurado por mohos
54-69	Firme/Semiduro	No madurado/Fresco
> 67	Blando	En salmuera

### 2.3. MICROBIOTA DE LOS QUESOS

Por la gran diversidad de quesos que existen, las características microbiológicas son muy diversas. Cada queso tiene su propia microbiota, con un extenso número de microorganismos que pueden multiplicarse. Además de los microorganismos iniciadores y/o otros que son añadidos para proporcionar las características de cada tipo de queso, existe una población microbiana contaminante. Esta microbiota contaminante puede provenir de la propia leche, los equipos, el aire, o incluso de los seres humanos que han tenido contacto directo con la leche o el queso. Por lo tanto, la microbiología del queso es diversa y su estudio requiere usualmente un conocimiento no sólo de la composición del producto, sino también de las condiciones de producción y maduración o almacenamiento (Neaves y Williams, 2010).

### 2.4. BACTERIAS PATÓGENAS EN LOS QUESOS

Aunque el queso sea considerado en general un alimento inocuo, en 2015 el 8% de todos los brotes transmitidos por alimentos se relacionaron con el queso según datos de la Unión Europea (EFSA, 2016). Los patógenos más importantes en la producción de queso son *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. y *E. coli* diarreagénicos (DEC).

## Introducción general y objetivos

En los últimos años, algunos brotes infecciosos de origen alimentario, como el originado en 2011 a partir de semillas contaminadas con *E. coli* O104 con repercusión en Alemania y otros países europeos, han tenido consecuencias que, aunque variadas, en todos los casos han sido muy graves. Además de comprometer la salud pública, repercute en un deterioro de la percepción que los consumidores tienen de estos productos. Las pérdidas económicas para los operadores del sector son cuantiosas e, incluso, podrían suponer la finalización de la actividad económica para aquellas empresas implicadas. Por ello, algunas industrias del sector quesero son muy sensibles a esta problemática y se interesan por métodos o procedimientos avalados científicamente aunque aplicables desde un punto de vista industrial, encaminados a reducir tales riesgos.

Así pues, en los últimos años tipos de *E. coli* con capacidad para producir enfermedad intestinal en los seres humanos son de creciente interés por su incidencia en una gran variedad de alimentos entre los que se encuentra el queso.

### 3. *E. COLI* DIARREAGÉNICOS

*E. coli* es una bacteria Gram-negativa, oxidasa-negativa, en forma de bacilo y perteneciente a familia de las *Enterobacteriaceae*. Es capaz de crecer aeróbicamente y anaeróbicamente, preferiblemente a temperatura de 37 °C, y puede ser inmóvil o móvil. Otras características bioquímicas incluyen la fermentación de la lactosa, producción de indol, la falta de fermentación de citrato, la prueba positiva de rojo de metilo y la ureasa negativa (Scheutz y Strockbine, 2015).

*E. coli* habita principalmente en el tracto intestinal inferior de los animales de sangre caliente, incluidos los humanos. Por esta razón, se utiliza frecuentemente como indicador de contaminación fecal de agua y alimentos. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* vivan inofensivas en el intestino y raramente causan enfermedad en individuos sanos, una serie de cepas patógenas pueden causar enfermedades intestinales (DEC) y extra intestinales tanto en individuos sanos como inmunocomprometidos (Gomes et al., 2016).

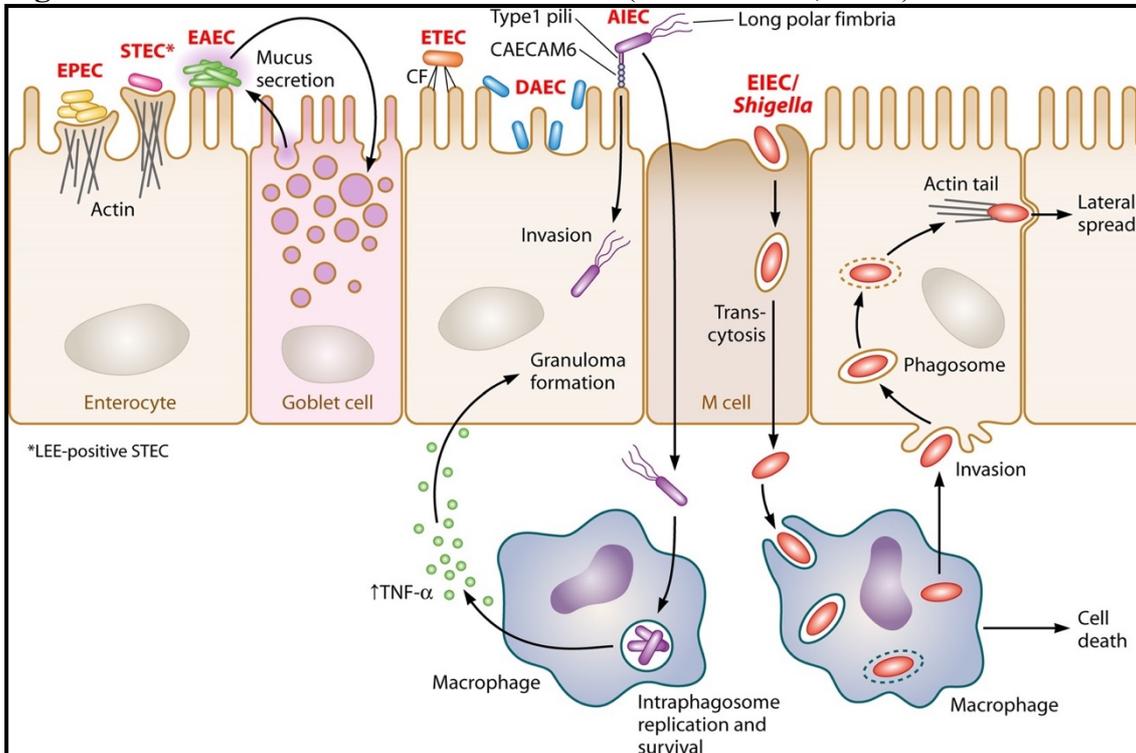
#### 3.1. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS

Aunque la gran parte de *E. coli* no sean patógenos, la gran capacidad de ganar y perder elementos genéticos reflejan la plasticidad de su genoma, en el que el genoma básico o esencial (*core genome*) se complementa con otros elementos genéticos, muchos de los cuales pueden estar asociados con determinantes de virulencia (Pearson et al., 2016). Los elementos genéticos móviles pueden convertir *E. coli* en un patógeno altamente adaptado, que causa una serie de enfermedades (Tortora et al., 2013).

Basándose en el tipo de factor de virulencia presente y en los síntomas clínicos del hospedador, las cepas de *E. coli* se clasifican en patotipos, que son un grupo de cepas de la misma especie que causan una enfermedad común (Allocati et al., 2013). En la actualidad, DEC son clasificados en siete grandes grupos patógenos o patotipos (Figura 0.2): *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* difusoadherente (DAEC), *E. coli* adherenteinvasivo (AIEC), *E. coli*

enteropatógeno (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) (Croxen et al., 2013; Robins-Browne et al., 2016).

**Figura 0.2.** Patrones de adherencia de DEC (Croxen et al., 2013).



### 3.1.1. *E. coli* enteroagregativo (EAEC)

Fue identificado y clasificado por primera vez en 1987, por sus patrones de adherencia en las células HEP-2, en el que las bacterias se adhieren unas a otras en una configuración de “ladrillos apilados”, denominándose como enteroagregativa (Yang et al., 2017). Las EAEC son un grupo heterogéneo de cepas en cuanto a sus propiedades y genes de virulencia (Rivas et al., 2015) que no producen enterotoxinas termolábiles, termoestables ni toxina Shiga. Son cada vez más reconocidos como causa de diarrea persistente en niños y adultos tanto en países en desarrollo como en países industrializados. Han estado involucradas en brotes importantes en varios países (Kaper, 2005). La infección por EAEC se manifiesta clínicamente por una diarrea acuosa con o sin sangre y moco, dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre baja (Liu, 2015).

### 3.1.2. *E. coli* enterotoxigénico (ETEC)

Como sugiere su nombre, el patotipo ETEC es definido por la capacidad de producir una o más enterotoxinas. Las enterotoxinas específicas son la termolábiles y termoestables (Robins-Browne et al., 2016). Otra característica definitoria del patotipo es su capacidad de adherirse al epitelio intestinal, este proceso está mediado por la expresión de factores antigénicos de colonización (Rivas et al., 2015). El patotipo está principalmente asociado a falta de saneamiento, agua potable y tratamiento de aguas residuales en los países en desarrollo (Kaper, 2005; Torres, 2016). La capacidad de ETEC de sobrevivir a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo en alimentos cocinados, verduras crudas y en agua es un factor importante en la prevalencia de este microorganismo en las comunidades con un saneamiento deficiente (Torres, 2016). En los países desarrollados, la diarrea por ETEC es rara, aunque se han notificado brotes ocasionales en Noruega, Dinamarca, Japón y Corea (Yang et al., 2017).

### 3.1.3. *E. coli* enteroinvasivo (EIEC)

El patotipo EIEC tienen características bioquímicas, genéticas y patógenas muy similares a *Shigella*, que a menudo pueden dificultar la identificación correcta de este patotipo (Gomes et al., 2016). Están estrechamente relacionados, especialmente en términos de la enfermedad que causan, es decir, la disentería bacilar. El determinante clave de virulencia es un plásmido de virulencia conocido como pINV (Robins-Browne et al., 2016; Yang et al., 2017).

La diarrea debida a EIEC es causada por la invasión y penetración de las bacterias en los enterocitos, llevando a su destrucción. Estas bacterias se unen específicamente a la mucosa del intestino grueso e invaden las células por endocitosis (Gomes et al., 2016; Kaper, 2005). El modelo actual de patogénesis comprende: (I) penetración de células epiteliales seguido de, (II) lisis de la vacuola endocítica, (III) multiplicación intracelular, (IV) movimiento direccional a través del citoplasma y, (V) extensión en células epiteliales adyacentes (Liu, 2015).

#### 3.1.4. *E. coli* difusoadherente (DAEC)

El DAEC es un grupo heterogéneo y fue el último patotipo de DEC reconocido (Torres, 2016). Han surgido como un grupo único y se consideran distintos de otros patotipos, pero debido a las dificultades en la clasificación e identificación, la designación de DAEC como patotipo entérico de *E. coli* requiere estudios epidemiológicos adicionales (Croxen et al., 2013). Comprende cepas que muestran un patrón adherente difuso en las células HEp-2, pero no producen toxinas u otros factores de virulencia descritos para otros patotipos. DAEC causa un síndrome de diarrea acuosa en adultos y niños que pueden volverse persistentes. El riesgo de diarrea asociada con DAEC aumenta con la edad de los niños de 18 meses a 5 años (Kaper, 2005; Liu, 2015; Torres, 2016).

#### 3.1.5. *E. coli* invasiva (AIEC)

El patotipo de AIEC no expresa los factores de virulencia comunes encontrados en otras cepas patógenas de *E. coli* y la base genética para su fenotipo pro-inflamatorio e invasivo no se entiende completamente. Actualmente, las características de virulencia asociadas con AIEC son detectables sólo fenotípicamente, pero estudios genómicos recientes están empezando a definir algunos determinantes genéticos únicos que podrían ser utilizados para la identificación del patotipo en el futuro (Croxen et al., 2013). AIEC son inusuales entre los patotipos DEC, ya que no están asociados con diarrea. En cambio, se cree que contribuyen al desarrollo de la enfermedad de Crohn, que es una enfermedad crónica inflamatoria del intestino (Robins-Browne et al., 2016).

#### **4. EL GRUPO PATÓGENO *E. COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC)**

STEC son caracterizados por su serogrupo, genes de virulencia, toxinas y síntomas asociados a enfermedad, se denominan así porque producen una o más citotoxinas, llamadas Shiga toxina 1 (Stx1) y Shiga toxina 2 (Stx2) (Farrokh et al., 2013; Yang et al., 2017).

EHEC es un subconjunto de STEC y fue originalmente descrito por su asociación con la colitis hemorrágica (CH), que era clínicamente distinta de la shigelosis, y tenía rasgos genotípicos y fenotípicos que difieren de EPEC. El serogrupo EHEC más común es O157:H7 y ha sido objeto de muchos estudios, especialmente para los mecanismos de patogenicidad (Croxen et al., 2013).

##### **4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES**

El término STEC fue adoptado debido a la similitud de la toxina generada por el gen *stx1* a la toxina Shiga producido por *Shigella dysenteriae*. Los genes de las toxinas son normalmente adquiridos a través de un bacteriófago tipo lamboide (Baker et al., 2016; Croxen et al., 2013). Aunque se clasifican en dos grandes familias principales de toxinas (Stx1 y Stx2), cada una está compuesta por varias variantes. Los miembros de la subfamilia Stx1 incluyen Stx1a, Stx1c y Stx1d; mientras que Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g pertenecen al grupo Stx2 (Scheutz et al., 2012). Más que diferencias de secuencia, se ha reconocido que algunas de las variantes son clínicamente más relevantes ya que se han asociado con casos más graves de enfermedades, mientras que otros han sido relacionados con diarrea no complicada. A este respecto, se ha informado que las cepas que producen Stx2a, Stx2c o Stx2d son más patógenas que las variantes Stx1 solas o Stx1 y Stx2 asociadas (Scheutz, 2014). Por otro lado, las variantes Stx2e, Stx2f y Stx2g rara vez están implicadas en la enfermedad humana (Croxen et al., 2013).

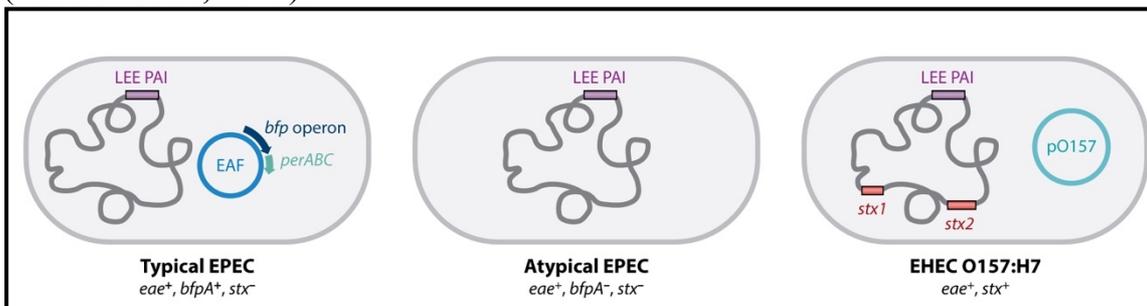
Aunque haya otros genes involucrados en las enfermedades provocadas por STEC, una gran cantidad de datos epidemiológicos no dejan dudas de que la

toxina Shiga es responsable de la producción de CH y el síndrome urémico hemolítico (SUH).

La mayoría de EHEC puede diferenciarse de STEC ya que poseen marcadores de virulencia accesoria como una isla de patogenicidad denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE) y un plásmido de virulencia conocido como pO157 (Figura 0.3), que son comunes en las cepas asociadas con la enfermedad. Sin embargo, no todos los EHEC contienen estos marcadores de virulencia accesoria y es a menudo difícil determinar qué cepas de STEC tienen el potencial de causar enfermedad (Rivas et al., 2015). En general, EHEC es LEE positivo y forma lesiones intestinales de adhesión y borrado (A/E) como EPEC. Sin embargo, el término EHEC también se ha usado en la literatura para describir cepas de STEC negativas para LEE, tales como los serotipos O91:H21, O104:H4 y O113:H21, que han causado CH y SUH (Croxen et al., 2013).

El carácter zoonótico de las infecciones por STEC está bien establecido. Las bacterias están ampliamente distribuidas en el tracto gastrointestinal de una amplia diversidad de especies animales, normalmente como portadores asintomáticos. Varias especies de rumiantes, especialmente el vacuno, son considerados como el principal reservorio, pero otras mamíferos domésticos y salvajes, aves y peces, también han sido implicados en la transmisión de STEC (Torres, 2016).

**Figura 0.3.** Representación esquemática de regiones genéticas asociadas con virulencia en EPEC y EHEC O157:H7. Demuestra las diferencias genéticas utilizadas para diagnosticar entre tEPEC, aEPEC y EHEC O157:H7 (Pearson et al., 2016).



La transmisión por STEC a los seres humanos ocurre principalmente por comer o manejar alimentos contaminados y entrar en contacto con animales infectados. Este patotipo puede crecer en un amplio rango de temperaturas y pH. Una gran variedad de alimentos han estado involucrados en brotes por estas bacterias, entre los que se encuentran carne picada poco hecha, leche cruda, verduras y frutas (Torres, 2016; Yang et al., 2017).

### 4.2. REPERCUSIONES PARA LA SALUD PÚBLICA

El número de STEC necesarios para causar infección humana es bajo. En los alimentos contaminados, la presencia de menos de 1.000 bacterias puede causar infección humana (Yang et al., 2017), aunque el serotipo O157:H7 puede causar infecciones con menos de 100 bacterias, y por esta baja dosis infectante es uno de los patógenos con más importancia en la cadena de leche, ya que el ganado bovino es su reservorio principal (Farrokh et al., 2013).

Segundo datos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2016), en el año 2015 fueron diagnosticados 5.901 casos de enfermedad por STEC en la Unión Europea (UE). En ese año, 232 pacientes desarrollaron SUH (de un total de 3.352 casos confirmados). El 65% de los casos de SUH se diagnosticaron en niños menores de cuatro años, los serogrupos más comunes entre los casos de SUH fueron O157 y O26 (27,9%), O80 (8,8%) y O55 (5,9%), mientras que el 14,2% no eran tipables. La tasa de mortalidad por STEC fue del 0,2%, los serogrupos asociados fueron O157 (dos casos), O182 (un caso), O111 (un caso), O91 (un caso), O55 (un caso) y un caso de una cepa no tipificable. A nivel nacional, en ese mismo año 2015 se declararon 21 casos (4 por el serotipo O157:H7) en cinco Comunidades Autónomas, cuatro de ellos en pacientes de Castilla y León (Instituto de Salud Carlos III, 2017).

## 5. EL PATOTIPO *E. COLI* ENTEROPATÓGENICO (EPEC)

EPEC fue el primer patotipo de DEC que se identificó. El término EPEC se utilizó por primera vez en 1955 para describir una serie de cepas de *E. coli* epidemiológicamente relacionadas con una serie de brotes de diarrea infantil en las décadas de 1940 y 1950 (Croxen et al., 2013; Robins-Browne et al., 2016; Yang et al., 2017).

### 5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Como grupo, EPEC se caracteriza por la presencia de la isla de patogenicidad LEE (Figura 0.3). Esta isla de 40 kbp codifica para (i) una proteína adhesiva de membrana externa, conocida como intimina, asociada al gen *eae*, (ii) el sistema de secreción proteica tipo III, (iii) y varias proteínas efectoras secretadas, incluyendo la proteína Tir que es el receptor translocado para intimina (Robins-Browne et al., 2016; Yang et al., 2017). En general, se definen como cepas productoras de diarrea que originan lesiones intestinales de A/E, pero que no poseen los genes que codifican para las toxinas Shiga (Kaper, 2005; Liu, 2015).

Los avances de las técnicas moleculares permitieron a lo largo de los años una comprensión mejor del genoma y los mecanismos de virulencia entre las cepas EPEC y han llevado a la subclasificación de EPEC en típica (tEPEC) y atípica (aEPEC) (Gomes et al., 2016; Pearson et al., 2016). La clasificación en subtipos "típicos" y "atípicos" está basada en la presencia o ausencia del plásmido del factor de adherencia de *E. coli* (pEAF), según se puede observar en la Figura 0.3. Las aEPEC tiene la capacidad de causar lesiones A/E en el intestino, pero carecen del plásmido pEAF (Croxen et al., 2013; Gomes et al., 2016; Torres, 2016).

Los seres humanos son casi exclusivamente o reservorio conocido para tEPEC, siendo los niños sintomáticos y asintomáticos y los adultos asintomáticos la fuente más probable. Por el contrario, las cepas atípicas se han aislado de fuentes humanas y animales, incluyendo perros, conejos, monos, ovejas y bovinos (Croxen et al., 2013; Torres, 2016). Mientras que la prevalencia de cepas

tEPEC ha disminuido en la última década en la mayoría de las áreas geográficas estudiadas, las cepas de aEPEC se consideran enteropatógenos emergentes que se han detectado en todo el mundo. Además, la detección de aEPEC en diferentes especies animales, así como en muestras alimentarias y ambientales, sugiere que algunas infecciones aEPEC pueden ser zoonóticas (Torres, 2016).

Los síntomas más comunes de EPEC son diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre. Estos síntomas pueden persistir durante varios días, pero también se ha observado EPEC crónica (Liu, 2015; Torres, 2016). Se ha estimado que la dosis infectante de EPEC en adultos sanos es de  $10^8$  ufc (Croxen et al., 2013).

### 5.2. REPERCUSIONES PARA LA SALUD PÚBLICA

Se estima que la diarrea es la causa de más de 800.000 muertes en niños menores de 5 años, principalmente en países en desarrollo, siendo EPEC uno de los principales agentes infecciosos responsables de la enfermedad.

Aunque durante muchos años las cepas de tEPEC han sido consideradas el principal agente de diarrea en niños en países en desarrollo, en los últimos años se ha observado una disminución en estos países. Las razones de esta disminución no están totalmente esclarecidas, pero pueden estar vinculadas a mejoras en las medidas de la salud pública. Por otro lado, se ha indicado un aumento en la detección de aEPEC en países en desarrollo y sigue siendo frecuentemente detectada en países desarrollados (Hu y Torres, 2015). La ocurrencia de brotes de diarrea debido a infecciones por aEPEC ha sido informada en varias partes del mundo, como Finlandia, Japón, China, Corea del Sur y Brasil (Hao et al., 2012; Park et al., 2014; Vieira et al., 2016; Viljanen et al., 1990; Yatsuyanagi et al., 2003). Los serogrupos frecuentemente involucrados pertenecían tanto a los clásicos (O39, O111, O127, O157) como a los no clásicos (O2, O33, O108).

## 6. TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE STEC Y EPEC

La mayoría de los microorganismos patógenos de transmisión alimentaria que pueden estar presentes en los alimentos suelen estar en bajas concentraciones y distribuidos irregularmente, representando un desafío en la hora de su detección (Baker et al., 2016). Generalmente, las técnicas consideradas estándar para la detección de patógenos en alimentos forman parte de métodos basados en el cultivo del microorganismo, consistiendo en múltiples etapas de incubación (pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, cultivo selectivo y diferencial) para el aislamiento bacteriano seguido de pruebas biológicas, serológicas o moleculares adicionales para la confirmación (Wang et al., 2013).

El grupo de *E. coli* patógenos son un grupo fenotípicamente diverso y actualmente no existe un único método que se pueda usar para enriquecer, aislar o seleccionar los diversos patotipos que existen. En consecuencia, se han desarrollado métodos para detectar o aislar los patotipos de principal interés.

Además del patotipo, las cepas de *E. coli* pueden ser tipificadas usando una variedad de técnicas que en caso de brotes ayudan a establecer relaciones entre diferentes aislamientos de bacterias, por tanto pueden determinar la fuente del brote y establecer las vías de transmisión de los patógenos (Rivas et al., 2015; Robins-Browne et al., 2016).

Los sistemas de tipificación tradicionales basados en el fenotipo, tales como el perfil bioquímico y el serotipado, se han utilizado durante muchos años. Sin embargo, los métodos que examinan la relación de los aislamientos a nivel molecular han revolucionado nuestra capacidad de diferenciación entre cepas (Sabat et al., 2013). Algunos de los métodos utilizados son considerados de referencia internacional (por ejemplo, la electroforesis en gel de campo pulsado – PFGE-). Los métodos más comúnmente utilizados para la tipificación de patotipos de *E. coli* son los bioquímicos, serotipado, PFGE y *Multilocus Sequence Typing* –MLST- (Rivas et al., 2015).

## 6.1. ENRIQUECIMIENTO

El primer paso para la detección de STEC es enriquecer la muestra que se analizará. Los medios de enriquecimiento varían en su composición, pero en general proporcionan un entorno apropiado para aumentar la población de células bacterianas. Tales constituyentes proporcionan una matriz nutricional de apoyo para el crecimiento de los microorganismos, o en el caso de un medio de enriquecimiento selectivo, una población de microorganismos específicos (Baker et al., 2016). Además, el enriquecimiento se usa para recuperar células dañadas y/o estresadas y diluir el efecto inhibitorio de algunos alimentos.

Aunque STEC pueda crecer en diversas condiciones, proporcionar un entorno con las concentraciones de nutriente apropiadas, un rango de pH de 6,5 a 7,5 y un adecuado volumen del medio de enriquecimiento son generalmente necesarios para lograr un crecimiento óptimo del microorganismo. Se ha sugerido que un paso de enriquecimiento puede ser inevitable, debido al requisito de detectar células individuales de STEC (Wang et al., 2013).

Para la detección de *E. coli* O157:H7 y no-O157, los medios de enriquecimiento normalmente utilizados son el *Tryptone Soy Broth* (TSB) y el caldo de *E. coli* (EC), incubados a 35-37 °C durante 16-24 horas (Vimont et al., 2006). Para suprimir la actividad antagonista de la microbiota acompañante, fue recomendada la incubación a 42 °C aunque esta temperatura también puede interferir con la recuperación de las células dañadas (Farrokh et al., 2013). Además, los caldos de enriquecimiento pueden ser complementados con agentes selectivos como el telurito de potasio y antibióticos, especialmente novobiocina. Sin embargo, la adición de novobiocina puede inhibir el crecimiento de algunas STEC (Vimont et al., 2006).

Actualmente el *Food Safety and Inspection Service* (EE.UU.) recomienda para la detección de *E. coli* O157:H7 y de los serogrupos incluidos en los denominados “*big six*” (O26, O45, O103, O111, O121 y O145) el uso del *Modified Tryptone Soya Broth* (mTSB) para el enriquecimiento de muestras de productos de carne cruda (FSIS, 2014a, 2014b). El principal componente del medio mTSB es el digerido pancreático de caseína que proporciona compuestos

de carbono y nitrógeno que son esenciales para la producción de energía, la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos (Baker et al., 2016). Después del enriquecimiento en mTSB durante 15-24 horas, las muestras son examinadas a través de la técnica de PCR para detectar la presencia de genes de virulencia *stx* y *eae* y las muestras positivas son sembradas en agar específicos para la confirmación (FSIS, 2014a, 2014b).

El aislamiento e identificación de otros patotipos de *E. coli* que no son STEC es difícil debido a la falta de un medio que se pueda usar para enriquecer o seleccionar las cepas específicas (Rivas et al., 2015). Un método de aislamiento para *E. coli* patógenas (excepto STEC) se describe en el *Bacteriological Analytical Manual* (Feng et al., 2017). El método recomienda un pre-enriquecimiento de una muestra de 25 g de alimento en 225 ml de *Brain Heart Infusion* (BHI) a 35 °C durante 3 horas, para facilitar la recuperación de células dañadas. El pre-enriquecimiento se transfiere luego a 225 ml de caldo de *Tryptone Phosphate* (TP) y se incuba a 44 °C durante 20 h.

Por otro lado, en ocasiones el uso de la separación inmunomagnética (IMS) puede ser eficiente para la concentración de los microorganismos diana (Rivas et al., 2015).

## 6.2.MEDIOS SELECTIVOS

Cepas típicas de *E. coli* O157:H7 poseen algunas características capaces de diferenciarlas de otros serogrupos, como la incapacidad de metabolizar el sorbitol, carecer de la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa y ser más resistentes a cefixima y telurito. En base a una o más de estas propiedades, se han desarrollado medios de cultivo sólidos como el agar Sorbitol-MacConkey (SMAC) suplementado con cefixima-telurito (CT-SMAC) y ágaros cromogénicos que distinguen cepas de *E. coli* O157:H7 de la microbiota acompañante (Farrokh et al., 2013; Saxena et al., 2015). Sin embargo, los STEC no-O157 son un grupo bioquímicamente diverso y puede ser difícil distinguir de manera confiable y fácil entre los diferentes serogrupos O y cepas no patógenas utilizando métodos de cultivo actuales (Kase et al., 2015).

Además, hay comercialmente disponibles ágaros cromogénicos para el aislamiento de STEC no-O157 y O157:H7, que utilizan las diferencias enzimáticas de los serotipos, por ejemplo, CHROMagar™ STEC y CHROMagar™ O157. Tradicionalmente, los serogrupos de STEC se han considerado difíciles de distinguir en agar cromogénico, y aunque trabajos recientes sugieren que las distinciones fenotípicas pueden ser posibles, todavía se recomienda que se usen ensayos de confirmación independientes para complementar la identificación inicial con el agar cromogénico (Baker et al., 2016).

### 6.3. PRUEBAS DE DETECCIÓN MEDIANTE PCR

Las pruebas moleculares que permiten la detección o la cuantificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) ha contribuido a poner a punto sistemas de detección de STEC más eficientes y rápidos (Baker et al., 2016). Las pruebas que pueden ser utilizadas para la detección de STEC están basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), y técnicas de amplificación isotérmica (Wang et al., 2013).

Se han desarrollado cebadores para detectar genes de virulencia como *stx1*, *stx2* y *eae* y distinguir los patotipos de *E. coli* (Nataro y Kaper, 1998), así como los serotipos comunes de STEC (DebRoy et al., 2011; Fratamico y Bagi, 2012; Paddock et al., 2012; Paton y Paton, 1998). La detección de genes de virulencia no es garantía de expresión génica, y en el caso de múltiples cepas de STEC que contaminan una única muestra de alimento, se necesita confirmación adicional para determinar si los perfiles de genes detectados son de una sola cepa o de múltiples cepas diferentes (Wang et al., 2013).

A pesar de su popularidad generalizada, los sistemas de detección que dependen únicamente de la detección de los genes *stx*, *eae*, y de los marcadores de antígeno O para detectar STEC tienen una serie de limitaciones. Los enriquecimientos de heces de vacuno y de carne representan dos ejemplos que pueden contener una alta diversidad de cepas de *E. coli* con diferentes

combinaciones de marcadores genéticos, no asociados necesariamente a un único aislado (Rivas et al., 2015). Además, cepas de *E. coli* no perteneciente a los serogrupos patógenos pueden presentar alguno de los genes investigados (Rivas et al., 2015), y las muestras analizadas pueden contener fagos libres de *stx* que dificultan la interpretación de los resultados (Martínez-Castillo y Muniesa, 2014). Por lo tanto, cualquier método que dependa exclusivamente de la detección de los genes *stx*, *eae* y marcadores del antígeno O para detectar los principales STEC patógenos, requiere de confirmación por métodos de aislamiento de las cepas (Farrokh et al., 2013; Rivas et al., 2015).

Los aislados de STEC deben confirmarse en dos niveles: serotipo y producción de Stx o presencia de genes *stx*. Se pueden utilizar técnicas serológicas, el ensayo de cultivo de tejidos y los métodos basados en ácidos nucleicos (Farrokh et al., 2013).

### 6.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE EL PERFIL BIOQUÍMICO

El perfil bioquímico se ha utilizado para agrupar y separar cepas individuales de *E. coli*, particularmente en el período anterior a que se estableciera el serotipado para este propósito (Robins-Browne et al., 2016). Las pruebas bioquímicas implican la reacción de un aislado particular frente a una serie de pruebas bioquímicas que pueden incluir la fermentación de diversas fuentes de carbono y azúcares (O'Sullivan et al., 2006; Rivas et al., 2015). Sin embargo, el perfil bioquímico se está utilizando con menos frecuencia, ya que los ensayos moleculares pueden proporcionar información más discriminatoria entre los patotipos de *E. coli* (Robins-Browne et al., 2016). No obstante, el perfil bioquímico sigue teniendo un papel destacado en el aislamiento y la identificación preliminar de cepas de *E. coli* (de Boer et al., 2015; Rivas et al., 2015; Robins-Browne et al., 2016).

### 6.5. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE SEROTIPADO

La serotipificación se basa en el hecho de que las cepas de la misma especie pueden diferir en los antígenos expresados en su superficie celular. El

esquema tradicional de Kauffman para serotipificación de *E. coli* está basado en los perfiles del antígeno de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular) (Rivas et al., 2015). Dado que pocos laboratorios tenían la capacidad de tipificar el antígeno K, el patrón oro para serotipificación de *E. coli* está basado en los antígenos O y H (Fratamico et al., 2016). Actualmente se reconocen 186 diferentes antígenos O que definen un serogrupo y 53 antígenos H, que juntos definen el serotipo de un aislado (Fratamico et al., 2016; Rivas et al., 2015). Aunque el serotipado de *E. coli* sigue siendo el enfoque predominante por el cual las cepas patógenas se diferencian, la clasificación se produce comúnmente a través de la identificación de factores de virulencia únicos de las cepas (Rivas et al., 2015).

### 6.6. TIPIFICACIÓN MEDIANTE PFGE

En comparación con los métodos fenotípicos, los métodos genéticos de tipificación que se basan en el ADN bacteriano generalmente tienen una mejor capacidad discriminatoria (Fratamico et al., 2016). De los diversos métodos utilizados para *E. coli*, PFGE se considera el patrón de oro para la tipificación y se aplica en investigaciones epidemiológicas para discriminar cepas en brotes (Croxen et al., 2013). Por ser un método de un alto poder de discriminación, así como de reproducibilidad y facilidad para ser normalizado, actualmente existe una base de datos internacional (PulseNet International) para el depósito de perfiles de PFGE que sirve para la vigilancia epidemiológica y las investigaciones de brotes de una gran cantidad de patógenos. En el año de 2006, la base de datos ya contaba con más de 25.000 perfiles de *E. coli* O157:H7 (Rivas et al., 2015).

Para la realización de la PFGE es necesario que tenga lugar la lisis celular en *plugs* de agarosa y la liberación de ADN cromosómico intacto, seguido de la restricción enzimática del ADN cromosómico y la separación de los fragmentos de ADN en una electroforesis de campo pulsado. El cambio periódico de la dirección de los pulsos eléctricos permite la separación de fragmentos de ADN con gran peso molecular, y los fragmentos de ADN separados se pueden visualizar en el gel como bandas, que forman un patrón o perfil.

## 6.7. TIPIFICACIÓN MEDIANTE MLST

El MLST es otro método que ha tomado gran importancia para la tipificación molecular de cepas de *E. coli* patógenas, y se considera el patrón de oro cuando se recurre a secuenciación (Robins-Browne et al., 2016). El método está basado en la secuenciación de genes (*housekeeping*) que son esenciales para el mantenimiento básico de la función celular. Tales genes están bajo una selección estabilizadora para mantener la función metabólica y evolucionar muy lentamente, proporcionando una medida confiable de las relaciones genéticas entre los aislados bacterianos (Pérez-Losada et al., 2017, 2013; Rivas et al., 2015).

Normalmente se utiliza la secuencia de regiones de 450-500 pb de 7-8 genes. Para cada uno de estos genes, las secuencias diferentes se corresponden con diferentes números de alelos. Así, los números de alelos obtenidos a partir de los 7-8 genes dan lugar a lo que se conoce como perfil de alelos o *sequence type* (ST). Además, las secuencias de los alelos y perfiles ST están disponibles en grandes bases de datos centrales (<http://pubmlst.org> y [www.mlst.net](http://www.mlst.net)) que se pueden consultar a través de internet. Estas bases de datos también proporcionan software en línea (eBURST) para la determinación de la relación genética entre cepas bacterianas dentro de una especie, así como mapas para rastrear los aislamientos de cada ST que se han recuperado de cada país y los detalles de estos aislamientos. (Pérez-Losada et al., 2017, 2013; Sabat et al., 2013).

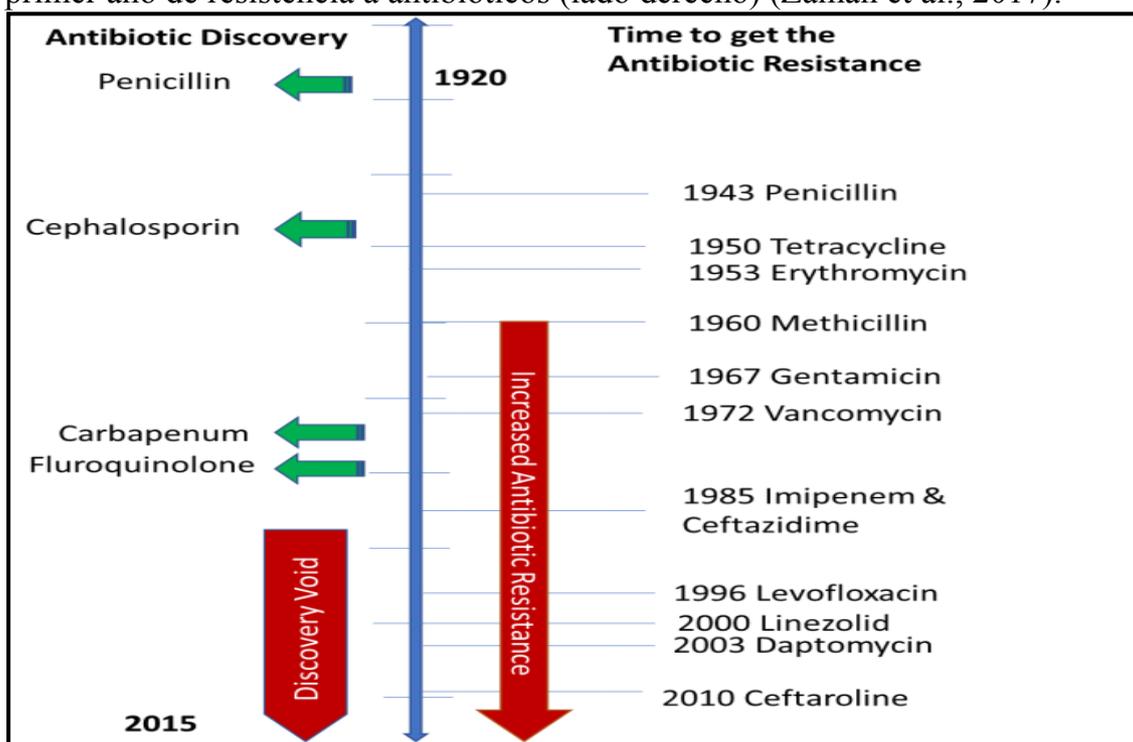
Se han propuesto tres esquemas MLST para *E. coli*: el de Thomas Whittam depositado en la Universidad de Michigan (Reid et al., 2000), el propuesto por Mark Achtman en Warwick Medical School (Wirth et al., 2006), y el desarrollado por Sylvain Brisse y Erick Denamur en el Instituto Pasteur (Jaureguy et al., 2008). Cada uno está basado en un conjunto diferente de genes. El esquema de Mark Achtman, que utiliza 7 genes *housekeeping*, parece ser el más estable y congruente cuando es utilizado para análisis filogenético del genoma total (Robins-Browne et al., 2016).

## 7. PANORAMA GENERAL DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *E. COLI*

El uso de los antibióticos todavía no ha completado 100 años y ya ha salvado millones de vidas a través de la importante reducción de muertes prematuras por infecciones bacterianas. Desafortunadamente, poco después de la introducción de los antibióticos se publicaron informes sobre la aparición de bacterias que presentaban resistencia a los mismos (Figura 0.4). Desde entonces, la resistencia antimicrobiana se ha convertido en el factor más importante en el campo de las enfermedades infecciosas y un gran problema para la salud pública mundial (Marinelli y Genilloud, 2014).

En 2009 se estimó que en Europa las bacterias resistentes eran responsables de 25.000 muertes y que su coste alcanzaba los 1,5 billones de euros anuales (ECDC, 2014). En los EE.UU. anualmente más de 2 millones de personas son infectadas con bacterias resistentes a los antibióticos con 23.000 muertes como resultado directo (Blair et al., 2014).

**Figura 0.4.** Representación gráfica de la evolución del uso de los antibióticos y la aparición de resistencias. Descubrimiento de antibióticos (flecha verde) y el primer año de resistencia a antibióticos (lado derecho) (Zaman et al., 2017).



## 7.1.FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA APARICIÓN DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Las bacterias pueden ser intrínsecamente resistentes a ciertos antibióticos, pero también pueden adquirir resistencia a los antibióticos a través de mutaciones en genes cromosómicos y por transferencia horizontal de genes (Blair et al., 2014). Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos que se transmiten entre las bacterias implican la desintoxicación de la molécula de antibiótico o mutaciones en la diana del antibiótico. Las moléculas de antibióticos pueden (i) ser destruidas, (ii) modificadas para ser menos eficientes, o (iii) eliminadas por bombas de eflujo. Los objetivos de los antibióticos pueden ser (i) modificados enzimáticamente, (ii) tornarse insensibles por mutaciones, (iii) protegidos por una barrera y (iv) reemplazados (Lee et al., 2010; Marinelli y Genilloud, 2014).

Aunque la transferencia horizontal de genes entre especies e intra especies de bacterias sea el principal proceso de creación de bacterias multirresistentes (Marinelli y Genilloud, 2014), es el uso de antibióticos que ejerce presión ecológica sobre las bacterias y contribuye a la aparición y selección de las bacterias multirresistentes. Mientras que las malas prácticas de prevención y control de infecciones y las condiciones sanitarias inadecuadas favorecen la propagación de estas bacterias (ECDC, 2014).

Una proporción sustancial del uso de antibióticos ocurre fuera del campo de la medicina humana. El uso de antimicrobianos en los animales de producción, con el fin de actuar como promotor de crecimiento o para tratar enfermedades, probablemente sea uno de los principales factores que contribuyan al problema general de la resistencia. Se estima que dos tercios de todos los antibióticos producidos mundialmente son utilizados en animales de producción. El uso de antibióticos como promotores del crecimiento ha sido completamente prohibido en Europa desde 2006, pero sigue siendo una práctica común en varios países, incluidos los EE.UU. (Prestinaci et al., 2015). Las clases de antibióticos más utilizados en ganadería destinada a la producción de alimentos son

tetraciclinas, penicilinas y sulfonamidas, que en la UE representan el 71% de las ventas de antibióticos (Singer et al., 2016).

## 7.2.RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN *E. COLI* PATÓGENOS

*E. coli*, por ser comensales del intestino de los animales de sangre caliente, son frecuentemente sometidos al contacto con antibióticos administrados a sus huéspedes, lo que puede ser un factor para la selección de bacterias resistentes frente a los antibióticos suministrados (Looft et al., 2012). Cepas resistentes han sido aisladas en todas las partes del mundo, su transmisión puede ser directamente a partir de animales (zoonosis) o a través de la cadena alimentaria. *E. coli* patógenos son uno de los principales agentes infecciosos de origen alimentario y uno de los mayores retos para la salud pública mundial (Torres, 2016).

La resistencia en *E. coli* se desarrolla ya sea a través de mutaciones puntuales de los genes diana de los antibióticos o por adquisición de elementos genéticos móviles. Los principales mecanismos de resistencia antimicrobiana de *E. coli* se resumen en la Tabla 0.4. Estos mecanismos no solo se dan de forma aislada, sino que pueden aparecer dos o más. Así, se pueden clasificar en función del número de resistencias: MDR (*multidrug-resistant*), que se definen como aquel que es resistente al menos a un agente antimicrobiano de tres o más categorías de antimicrobianos; XDR (*extensively drug-resistant*), cuando es resistente al menos a un antimicrobiano de todas las categorías salvo dos o menos categorías, y PDR (*pandrug-resistant*), cuando el aislado es resistente a todos los antibióticos de todas las categorías (Magiorakos et al., 2012).

**Tabla 0.4.** Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana estudiados en *E. coli* (Torres, 2016).

<b>Antibióticos</b>	<b>Mecanismo de resistencia</b>	<b>Genes involucrados</b>
β-lactámicos	β-lactamasas: enzimas que degradan la estructura del antibiótico por hidrólisis	Genes que codifican β-lactamasas: <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CARB</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> y <i>bla</i> <sub>GES</sub>
Quinolonas	Mutación singular que altera la diana del antibiótico	Las mutaciones en <i>gyrA</i> (gen que codifica una subunidad de la DNA girasa) y <i>parC</i> (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV)
	Alteración de los mecanismos de permeabilidad (bombas de expulsión y canales de difusión)	AcrAB-like
	Resistencia antimicrobiana transportada por plásmidos	La familia de los genes <i>Qnr</i> (A, B, C, D, S) codifican proteínas que interfiere en la unión del antibiótico con su diana
Tetraciclinas	Bombas de expulsión específicas	Genes: <i>tetA</i> y <i>tetB</i>
Cloranfenicol	Inactivación enzimática mediada por acetilación	Gen <i>cat</i>
	Reducción de la permeabilidad de la membrana	Genes <i>florR</i> y <i>cmlA</i>
Trimetropim-Sulfametoxazol	Mutación de las enzimas dianas	Genes <i>sul1</i> y <i>sul2</i> : resistencia a sulfametoxazol; genes <i>dfr</i> : resistencia a trimetropim

## **8. CONTROL MICROBIOLÓGICO MEDIANTE PROCESOS COMBINADOS NO TÉRMICOS EN ALIMENTOS**

Las tecnologías de conservación de alimentos tienen como principal objetivo controlar y eliminar los microorganismos, así como mejorar la calidad y proporcionar garantía de inocuidad a los productos alimenticios. El tratamiento térmico actualmente continua siendo la técnica clásica para alcanzar estos objetivos, aunque proporciona cambios en las características sensoriales y nutricionales de los alimentos (Morris et al., 2007; Ojha et al., 2016; Stoica et al., 2013).

Uno de los desarrollos más recientes en la industria alimentaria fue la implementación y diseño de tecnologías de procesamiento no térmico con el objetivo de reducir los impactos generados por los tratamientos térmicos (Soliva-Fortuny et al., 2011). Además, la demanda por los consumidores de productos alimentarios seguros y nutritivos, la eficiencia energética, y los requisitos legislativos y reglamentarios destinados a minimizar el uso de conservantes químicos justifican este interés (Ojha et al., 2016). Las tecnologías no térmicas también satisfacen las necesidades de la industria, ofreciendo productos de valor añadido, nuevas oportunidades de mercado y mayores márgenes de seguridad (Morris et al., 2007).

Los alimentos pueden ser tratados no térmicamente por irradiación, altas presiones hidrostáticas (APH), uso de antimicrobianos, ultrasonidos, micro y ultrafiltración y métodos eléctricos como campo eléctrico pulsante, pulsos de luz y campos magnéticos oscilantes. Durante el procesamiento no térmico, la temperatura de los alimentos se mantiene por debajo de la temperatura normalmente utilizada en el procesamiento térmico. Por lo tanto, se espera una degradación mínima de la calidad de los alimentos (Barbosa Cánovas et al., 2009; Raso y Barbosa-Cánovas, 2003).

## 8.1. ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS (APH)

APH es una de las tecnologías no térmicas más innovadora para la conservación de los alimentos, proporcionando pérdidas mínimas en su calidad. El tratamiento en condiciones adecuadas puede inactivar microorganismos patógenos y alterantes, proporcionando seguridad alimentaria y prolongando la vida útil de los alimentos. Además, es capaz de conservar el color, sabor, los nutrientes y la textura inherente de los alimentos. APH puede ser utilizada para la conservación de una gran variedad de alimentos: carnes, pescados, mariscos, productos lácteos, vegetales, platos listos para consumo y algunos productos fermentados como la cerveza o el vino (Stoica et al., 2013).

Los productos tratados por APH ya están ampliamente disponibles en EE.UU., Europa, Japón, Nueva Zelanda y Australia. Actualmente, más de 200 empresas utilizan las APH y producen anualmente más de 600.000 toneladas de productos (Knoerzer, 2016).

El proceso de alta presión se lleva a cabo con una presión intensa de 100-1000 MPa con variaciones de temperaturas (0-110 °C) y tiempo. Existen dos principios científicos generales que son de relevancia directa para el uso de APH: el principio de *Le Chatelier* y la regla isostática. El primero, establece que cuando un sistema en equilibrio es perturbado, el sistema responde intentando minimizar la perturbación. Esto significa, que cualquier fenómeno (transición de fase, reactividad química, cambio en la configuración molecular o reacción química) acompañado de una disminución del volumen se verá incrementado por la presión. Sin embargo, una acumulación de presión se acompaña siempre de un aumento de temperatura en el producto mediante calentamiento adiabático. Tomando el agua como ejemplo, su temperatura aumenta aproximadamente 3 °C cada 100 MPa a una temperatura inicial de 25 °C y una velocidad de presurización de 100 MPa/s. En segundo lugar, la regla isostática establece que la presión se transmite instantánea y uniformemente a través de una muestra bajo presión, lo que significa que no importa la forma del alimento o el tamaño, la presión se distribuirá igualmente por todo el alimento (Morris et al., 2007; Stoica et al., 2013; Tao et al., 2014).

Entre las bacterias capaces de causar enfermedades transmitidas por los alimentos, probablemente *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* son las tres especies más estudiadas a través de la inactivación con APH (Tao et al., 2014). La inactivación de las bacterias por el sistema de APH se atribuye a varios tipos de daños que se acumulan en la célula. Los primeros daños provocados son en la membrana celular que pueden interrumpir su integridad y modificar sus propiedades, incluyendo la disminución de la fluidez, causando una transición de fase de la bicapa lipídica y desnaturalizando las proteínas ligadas a la membrana (Morris et al., 2007; Rivalain et al., 2010; Tao et al., 2014). Además, se han observado una serie de cambios estructurales y morfológicos dentro de la célula, como la compresión de las vacuolas, la condensación del nucléolo, la destrucción ribosómica y la inactivación de enzimas claves para el funcionamiento celular (Martínez-Rodríguez et al., 2012; Rivalain et al., 2010; Tao et al., 2014).

Aunque el tratamiento de APH pueda producir efectos antibacterianos significativos, la resistencia de las bacterias es altamente variable, dependiendo de la especie bacteriana y del producto alimenticio involucrado. Los factores críticos que pueden afectar a la eficacia de inactivación microbiana por los tratamientos son (i) características microbianas, generalmente las bacterias Gram-negativas son menos resistentes a la presión que las bacterias Gram-positivas, (ii) condiciones del proceso (nivel de presión, tiempo aplicado, tiempo para alcanzar la presión de tratamiento, calentamiento adiabático, tiempo de descompresión, temperatura de tratamiento y temperatura inicial del producto), y (iii) parámetros del producto, como el pH, la composición y la actividad de agua (Martínez-Rodríguez et al., 2012; Stoica et al., 2013).

Unas de las grandes preocupaciones en cualquier tratamiento para la conservación y seguridad alimentaria viene determinada por el daño sub-letal (daños reversibles) ocasionado a los microorganismos. La utilización de APH puede ocasionar también daños sub-letales en algunos microorganismos. Estas células vegetativas dañadas son más sensibles a otros factores, por lo que la combinación del tratamiento con otras tecnologías de conservación como el

envasado activo con agentes antimicrobianos puede aumentar su efecto de inactivación (Martínez-Rodríguez et al., 2012).

### 8.2. ENVASADO ACTIVO

Las principales funciones del envasado en los alimentos son la protección y la conservación general de los mismos hasta que estén a disposición de los consumidores, preservándoles de factores externos que pueden conducir a su degradación (temperatura, luz y humedad). Con la demanda creciente de los consumidores por productos de alta calidad, seguros, naturales y debido a la globalización, que permite el acceso de alimentos de todas las partes del mundo, se ha propiciado el desarrollo de nuevas tecnologías para la conservación de los alimentos (Malhotra et al., 2015; Ribeiro-Santos et al., 2017).

El desarrollo del envasado activo permite prologar la vida útil, la calidad y la seguridad de los alimentos (Majid et al., 2016; Werner et al., 2017). Frente a los sistemas de envasado tradicionales, que apenas suponen una barrera entre el producto y el ambiente exterior, el envasado activo interactúa con el producto y el ambiente para prolongar la vida útil, mejorar la seguridad y/o las propiedades sensoriales manteniendo la calidad del producto (Kapetanakou y Skandamis, 2016; Ribeiro-Santos et al., 2017; Rooney, 2005). Los principales sistemas de envasado activo incluyen captadores de O<sub>2</sub>, absorbentes de humedad y emisores de CO<sub>2</sub>, y los que incorporan antimicrobianos tienen gran interés científico y comercial (Kapetanakou y Skandamis, 2016).

### 8.3.ENVASADO ACTIVO ANTIMICROBIANO CON ACEITES ESENCIALES

El envase activo antimicrobiano actúa reduciendo, inhibiendo o retardando el crecimiento de microorganismos que pueden estar presentes en el alimento envasado o en el propio material de envasado, aumentando la vida útil y manteniendo la inocuidad y calidad del alimento (Lee y Han, 2011; Majid et al., 2016; Malhotra et al., 2015). La aplicación del agente antimicrobiano al envase activo puede realizarse por alguno de los modos siguientes:

1. Adición de compuestos antimicrobianos (volátiles y/o no volátiles) directamente en los alimentos (núcleo o en la superficie del alimento).
2. Inclusión de los compuestos antimicrobianos volátiles en el interior del envase (en una bolsita, sobre o etiqueta), pero sin contacto con el alimento.
3. Incorporación del compuesto antimicrobiano (volátiles y/o no volátiles) a portadores que tienen contacto indirecto (una parte del compuesto antimicrobiano se inmoviliza al portador) con el alimento. El modo de acción se basa principalmente en la difusión. Sin embargo, si se utilizan compuestos antimicrobianos volátiles, una parte de la acción antimicrobiana está relacionada con los vapores liberados.

La adición directa de compuestos antimicrobianos tiene inconvenientes significativos, principalmente por su interacción entre el compuesto antimicrobiano y los componentes del alimento, que pueden comprometer la eficacia e interferir en la calidad sensorial de los alimentos tratados. Por el contrario, cuando el compuesto antimicrobiano es aplicado a través de portadores, el compuesto activo se libera gradualmente dentro del envase a lo largo de toda la vida útil del producto (Kapetanakou y Skandamis, 2016).

Aunque en el envasado activo es posible incorporar varias sustancias con acción antimicrobiana (ácidos orgánicos, bacteriocinas, extractos de especias, tiosulfatos, enzimas, proteínas, isotiocianatos, antibióticos, fungicidas, agentes quelantes, parabenos y metales), es muy apreciada por los consumidores la utilización de productos naturales. Por lo tanto, se han estudiado nuevas

alternativas de fuentes naturales como los aceites esenciales (AE) o los envasados renovables y biodegradables (Majid et al., 2016; Ribeiro-Santos et al., 2017).

En los últimos años, ha tenido lugar una creciente atención a varios antimicrobianos naturales para formar parte de sistemas de envasado antimicrobiano, tales como los AE. Los AE son líquidos aceitosos y aromáticos obtenidos de vegetales (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, madera, frutas y raíces). Son producidos a partir de más de 17.000 plantas aromáticas. Sus componentes demuestran actividad antibacteriana y antifúngica contra una gama amplia de microorganismos patógenos (Pandey et al., 2017).

La actividad antimicrobiana de los AE está directamente correlacionada con la presencia de sus componentes volátiles bioactivos, que pueden ser compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides (Oliveira et al., 2015). Aunque los compuestos fenólicos (carvacrol, timol, safrol, eugenol) parecen ser los principales responsables de la actividad antibacteriana, no se puede atribuir la acción a un compuesto, sino a la acción combinada de varios (Burt, 2004; Ribeiro-Santos et al., 2017).

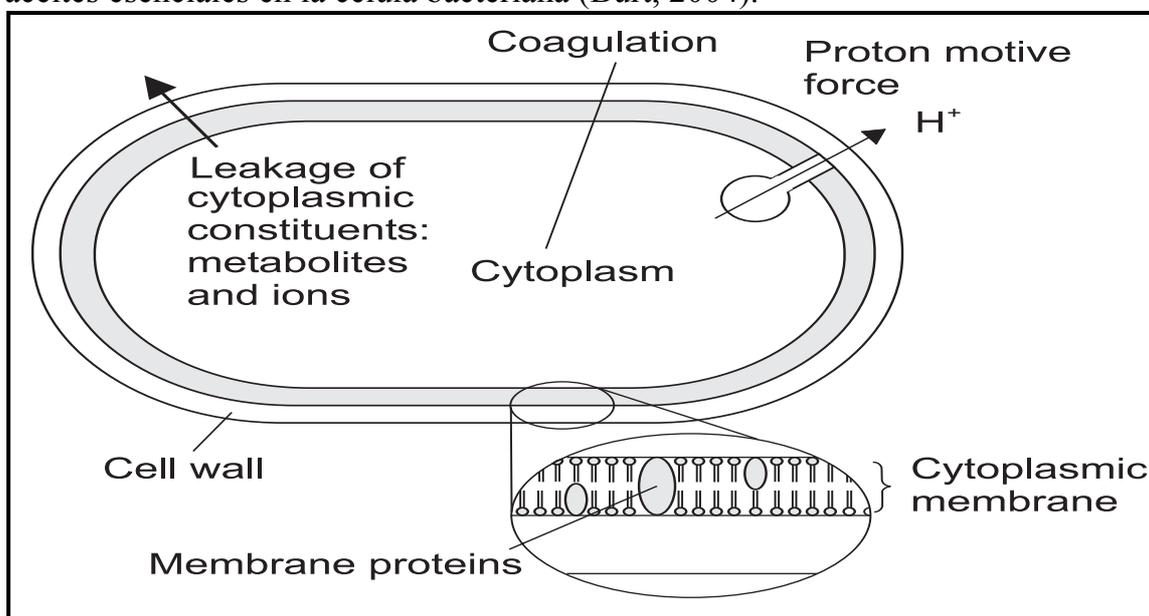
La composición y calidad de los AE puede verse afectada por características de la planta, como la etapa de desarrollo, la variedad, el origen geográfico, la parte de la planta utilizada, la edad, la estación y la condición de la planta cuando se cosecha. Además, el método de extracción utilizado también influye en la composición de los AE (Calo et al., 2015; Ribeiro-Santos et al., 2017).

La actividad antibacteriana de los AE pueden ser bacteriostática, por la inhibición del crecimiento bacteriano, o bactericida, produciendo la destrucción de las células bacterianas (Burt, 2004). Su mecanismo de acción antimicrobiano no está totalmente elucidado hasta la fecha. Parece ser que su acción desestabiliza principalmente la arquitectura celular, llevando a la descomposición de la integridad de la membrana y aumentando su permeabilidad, lo que interrumpe muchas actividades celulares. Además, otros efectos producidos se esquematizan en la Figura 0.5, como son daño en la membrana citoplasmática,

inducción de la fuga del contenido celular, coagulación del citoplasma y el agotamiento de la fuerza protón-motriz (Burt, 2004; Calo et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Swamy et al., 2016).

Las bacterias Gram-negativas son más resistentes a los AE que las bacterias Gram-positivas debido a la diferencia en la estructura de la pared celular. La membrana celular exterior de las bacterias Gram-negativas dificulta que los compuestos hidrófobos penetren en su membrana (Calo et al., 2015; Villa y Veiga-Crespo, 2014).

**Figura 0.5.** Localización y mecanismos de acción de los componentes de los aceites esenciales en la célula bacteriana (Burt, 2004).



El tomillo es una de las plantas aromáticas y medicinales de mayor interés comercial, principalmente los correspondientes a las especies *T. serpyllum* y *T. vulgaris* (Assiri et al., 2016; Liu et al., 2017; Sakkas y Papadopoulou, 2017). Su composición posee varios compuestos bioactivos, incluyendo flavonoides y ácidos fenólicos, de los cuales timol (48,6%), p-cimeno (22,9%),  $\alpha$ -terpinoleno (6,49%), y carvacrol (2%) son los principales constituyentes con efecto bactericida (Assiri et al., 2016; Burt, 2004).

#### 8.4. TRATAMIENTOS COMBINADOS DE CONSERVACIÓN

Según el “concepto de las barreras”, la combinación de diferentes procesos puede lograr el control microbiológico de los alimentos cuando la utilización de tratamientos individualmente no podría garantizarlo (Oliveira et al., 2015). Como se ha mencionado anteriormente, la utilización de tratamientos de APH puede provocar daños sub-letales en algunos microorganismos, con lo que en condiciones favorables podrían volver a ser viables, y las bacterias Gram-negativas son más resistentes a los AE que las Gram-positivas. Por tanto, la combinación de los dos tratamientos puede ocasionar un efecto sinérgico ya que el daño provocado en la membrana celular bacteriana por el tratamiento de APH deja a éstas susceptibles a los efectos de los AE. En los últimos años diversos estudios demostraron la eficacia de la combinación de los tratamientos de APH y AE en el control de bacterias patógenas (Evrendilek y Balasubramaniam, 2011; Pérez Pulido et al., 2012; Sanz-Puig et al., 2017; Stratakos et al., 2015).

Además de la eliminación de los microorganismos, la combinación de los tratamientos puede ser útil para disminuir su intensidad, ya sea por una menor aplicación de presión o por la utilización de concentraciones menores de AE (Pérez Pulido et al., 2012).

## 9. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

El objetivo general de esta tesis doctoral fue aportar conocimiento para la mejora de la calidad de la leche de vaca a partir de la detección de las posibles vías de contaminación por los tipos patógenos *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) y enteropatogénico (EPEC), y su control en queso mediante procesos combinados.

El objetivo general se desarrolló a partir de la consecución de los siguientes objetivos concretos:

- 1.Utilizando técnicas de aislamiento en placa y basadas en la PCR, determinar la importancia de la leche de vaca y de los quesos de leche cruda madurados como vehículos de STEC y EPEC en Castilla y León.
- 2.Caracterizar las cepas de STEC y EPEC aisladas de leche de vaca y del ambiente de explotaciones de vacuno lechero, determinando su importancia como portadoras de resistencias a compuestos antimicrobianos.
- 3.Determinar las fuentes principales de contaminación de STEC y EPEC en leche de vaca y quesos derivados a partir del establecimiento de las relaciones genéticas (técnicas moleculares) entre las cepas aisladas de leche, queso, manipuladores, agua, pienso, heces y aire.
- 4.Seleccionar la combinación antimicrobiana más eficaz para su utilización en un sistema de envasado activo para el control de STEC y EPEC en quesos elaborados a partir de leche cruda.
- 5.Conocer el comportamiento de cepas potencialmente patógenas de STEC y EPEC durante la fabricación y maduración de queso elaborado a partir de leche cruda de vaca.
- 6.Evaluar sistemas combinados de control de STEC y EPEC en queso madurado basados en altas presiones hidrostáticas y envasado activo antimicrobiano.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., Di Ilio, C., 2013. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 6235–6254. doi:10.3390/ijerph10126235
- Assiri, A.M.A., Elbanna, K., Abulreesh, H.H., Ramadan, M.F., 2016. Bioactive compounds of cold-pressed thyme (*Thymus vulgaris*) oil with antioxidant and antimicrobial properties. *J. Oleo Sci.* 65, 629–640. doi:10.5650/jos.ess16042
- Baker, C. a., Rubinelli, P.M., Park, S.H., Carbonero, F., Ricke, S.C., 2016. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. *Food Control* 59, 407–419. doi:10.1016/j.foodcont.2015.06.011
- Barbosa Cánovas, G.V., Góngora-Nieto, M.M., Rodriguez, J.J., 2009. Nonthermal processing technologies for food. *Food Eng.*
- Beloti, V., Tamanini, R., Nero, L.A., Moreira, M.A.S., Silva, L.C.C. da, Fagnani, R., Reis, K.T.M.G., 2015. Leite: Obtenção, inspeção e qualidade. Editora Planta, Londrina.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J. V., 2014. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13, 42–51. doi:10.1038/nrmicro3380
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control* 54, 111–119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040
- Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., Herman, L., 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* 31, 251–262. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.035
- 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*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 822–880. doi:10.1128/CMR.00022-13
- de Boer, R.F., Ferdous, M., Ott, A., Scheper, H.R., Wisselink, G.J., Heck, M.E., Rossen, J.W., Kooistra-Smid, A.M.D., 2015. Assessing the public health risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by use of a rapid diagnostic screening algorithm. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1588–1598. doi:10.1128/JCM.03590-14
- DebRoy, C., Roberts, E., Valadez, A.M., Dudley, E.G., Cutter, C.N., 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145, and O157 serogroups by multiplex polymerase chain reaction of the *wzx* gene of the O-antigen gene cluster. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 651–652. doi:10.1089/fpd.2010.0769

## Introducción general y objetivos

- ECDC, 2014. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)., Ecdc. doi:10.2900/39777
- EFSA, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J. 14, 1–231. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- Evrendilek, G.A., Balasubramaniam, V.M., 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. Food Control 22, 1435–1441. doi:10.1016/j.foodcont.2011.03.005
- FAO, 2013. Producción y productos lácteos: Producción lechera [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/produccion-lechera/es/#.WbKpWq2bJok> (accessed 9.8.17).
- FAO/WHO, 2011. Leche y Productos Lacteos, in: Codex Alimentarius. FAO/WHO, p. 267. doi:10.4067/S0718-07642015000500010
- FAOSTAT, 2017. FAOSTAT [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed 9.8.17).
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., Cerf, O., 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. Int. J. Food Microbiol. 162, 190–212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008
- Feng, P., Weagant, S.D., Jinneman, K., 2017. Diarrheagenic *Escherichia coli*, in: Bacteriological Analytical Manual (BAM). Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2017. Fundamentals of cheese science, 2nd ed. Springer, Boston. doi:10.1007/978-1-4899-7681-9
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., 2015. Dairy chemistry and biochemistry, 2nd ed. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-14892-2
- Fratamico, P.M., Bagi, L.K., 2012. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the GeneDisc real-time PCR system. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2, 1–6. doi:10.3389/fcimb.2012.00152
- Fratamico, P.M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M., Feng, P., 2016. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. Front. Microbiol. 7, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2016.00644
- FSIS, 2014a. Detection and isolation of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products and carcass and environmental sponges.

## Introducción general y objetivos

- FSIS, 2014b. Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat products and carcass and environmental sponges title: Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat.
- Gomes, T.A.T., Elias, W.P., Scaletsky, I.C.A., Guth, B.E.C., Rodrigues, J.F., Piazza, R.M.F., Ferreira, L.C.S., Martinez, M.B., 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian J. Microbiol. 47, 3–30. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015
- Hao, R., Qiu, S., Wang, Y., Yang, G., Su, W., Song, L., Zhang, J., Chen, J., Jia, L., Wang, L., Song, H., 2012. Quinolone-resistant *Escherichia coli* O127a:K63 serotype with an extended-spectrum-beta-lactamase phenotype from a food poisoning outbreak in China. J. Clin. Microbiol. 50, 2450–2451. doi:10.1128/JCM.00276-12
- Hu, J., Torres, A.G., 2015. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? Clin. Microbiol. Infect. 21, 729–734. doi:10.1016/j.cmi.2015.01.015
- ICMSF, 2005. Micro-organisms in foods, 6th ed, Microbial Ecology of Food Commodities. Springer US, Boston, MA. doi:10.1007/0-387-28801-5
- Instituto de Salud Carlos III, 2017. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2015.
- Janhøj, T., Qvist, K.B., 2010. The formation of cheese curd, in: Law, B.A., Tamime, A.Y. (Eds.), Technology of Cheesemaking. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 130–165. doi:10.1002/9781444323740.ch4
- 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, 1–14. doi:10.1186/1471-2164-9-560
- Kaper, J.B., 2005. Pathogenic *Escherichia coli*. Int. J. Med. Microbiol. 295, 355–356. doi:10.1016/j.ijmm.2005.06.008
- Kapetanakou, A.E., Skandamis, P.N., 2016. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: natural volatile antimicrobial compounds. Curr. Opin. Food Sci. 12, 1–12. doi:10.1016/j.cofs.2016.06.001
- Kase, J. a, Maounounen-Laasri, A., Son, I., Lin, A., Hammack, T.S., 2015. Comparison of eight different agars for the recovery of clinically relevant non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from baby spinach, cilantro, alfalfa sprouts and raw milk. Food Microbiol. 46, 280–287. doi:10.1016/j.fm.2014.08.020
- Knoerzer, K., 2016. Nonthermal and innovative food processing technologies, in: Reference Module in Food Science. Elsevier, pp. 1–4. doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.03414-4

## Introducción general y objetivos

- Lee, D.S., Han, J.H., 2011. Antimicrobial packaging, in: Zhang, H.Q., Barbosa-Cánovas, G. V., Balasubramaniam, V.M. (Eds.), *Nonthermal Processing Technologies for Food*. Blackwell, pp. 462–471.
- Lee, H.H., Molla, M.N., Cantor, C.R., Collins, J.J., 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467, 82–85. doi:10.1038/nature09354
- Liu, D., 2015. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*, in: *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier, pp. 1133–1146. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00064-0
- Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C.-N., Tang, G.-Y., Li, H.-B., 2017. Antibacterial and antifungal activities of spices. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2–62. doi:10.3390/ijms18061283
- Looft, T., Johnson, T. a, Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul, W.J., Stedtfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S. a, Tiedje, J.M., Stanton, T.B., 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109, 1691–1696. doi:10.1073/pnas.1120238109
- Lucey, J.A., 2015. Raw milk consumption. *Nutr. Today* 50, 189–193. doi:10.1097/NT.0000000000000108
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- MAGRAMA, 2014. Produccion de leche de vaca en explotaciones - España - Año 2014 [WWW Document]. URL [http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuadro\\_i\\_2014\\_tcm7-405082.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuadro_i_2014_tcm7-405082.pdf) (accessed 5.9.16).
- Majid, I., Ahmad Nayik, G., Mohammad Dar, S., Nanda, V., 2016. Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* doi:10.1016/j.jssas.2016.11.003
- Malhotra, B., Keshwani, A., Kharkwal, H., 2015. Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls. *Front. Microbiol.* 6, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.00611
- MAPAMA, 2014. Cifras de los principales indicadores de la industria alimentaria en la comunidad autónoma de Castilla y León, por subsectores [WWW Document]. URL [http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/7castillayleon2014\\_tcm7-156907.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/7castillayleon2014_tcm7-156907.pdf) (accessed 1.14.18).
- Marinelli, F., Genilloud, O., 2014. *Antimicrobials*. Springer, Berlin. doi:10.1007/978-3-642-39968-8
- Marth, E.H., Steele, J.L., 2000. *Applied dairy microbiology*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York.

## Introducción general y objetivos

- Martínez-Castillo, A., Muniesa, M., 2014. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–8. doi:10.3389/fcimb.2014.00046
- Martínez-Rodríguez, Y., Acosta-Muñiz, C., Olivas, G.I., Guerrero-Beltrán, J., Rodrigo-Aliaga, D., Sepúlveda, D.R., 2012. High hydrostatic pressure processing of cheese. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 399–416. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00192.x
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., 2013. *Advanced dairy chemistry*, 4th ed. Springer, Boston. doi:10.1007/978-1-4614-4714-6
- Moatsou, G., Moschopoulou, E., 2014. Microbiology of raw milk, in: *Dairy Microbiology and Biochemistry*. CRC Press, pp. 1–38. doi:10.1201/b17297-2
- Morris, C., Brody, A.L., Wicker, L., 2007. Non-thermal food processing/preservation technologies: a review with packaging implications. *Packag. Technol. Sci.* 20, 275–286. doi:10.1002/pts.789
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Neaves, P., Williams, A.P., 2010. Microbiological surveillance and control in cheese manufacture, in: Law, B.A., Tamime, A.Y. (Eds.), *Technology of Cheesemaking*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 384–412. doi:10.1002/9781444323740.ch11
- O’Sullivan, J., Bolton, D.J., Duffy, G., Baylis, C., Tozzoli, R., Wasteson, Y., Lofdahl, S., 2006. Methods for detection and molecular characterisation of pathogenic *Escherichia coli*.
- Ojha, K.S., Tiwari, B.K., O’Donnell, C., Kerry, J.P., 2016. Emerging nonthermal food preservation technologies, in: *Innovation and Future Trends in Food Manufacturing and Supply Chain Technologies*. Elsevier, pp. 257–274. doi:10.1016/B978-1-78242-447-5.00009-5
- Oliveira, T.L.C. de, Ramos, A.L.S., Ramos, E.M., Piccoli, R.H., Cristianini, M., 2015. Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.* 45, 60–85. doi:10.1016/j.tifs.2015.05.007
- Paddock, Z., Shi, X., Bai, J., Nagaraja, T.G., 2012. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet. Microbiol.* 156, 381–388. doi:10.1016/j.vetmic.2011.11.017
- Pandey, A.K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N.N., Bajpai, V.K., 2017. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Front. Microbiol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.02161

## Introducción general y objetivos

- Park, J.-H., Oh, S.-S., Oh, K.-H., Shin, J., Jang, E.J., Jun, B.-Y., Youn, S.-K., Cho, S.-H., 2014. Diarrheal outbreak caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45 in South Korea. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 775–781. doi:10.1089/fpd.2014.1754
- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598–602.
- Pearson, J.S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., Hartland, E.L., 2016. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu. Rev. Genet.* 50, 493–513. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035138
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., Castro-Nallar, E., 2017. Multilocus sequence typing of pathogens, in: Tibayrenc, M. (Ed.), *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*. Elsevier, Amsterdam, pp. 383–404. doi:10.1016/B978-0-12-799942-5.00016-0
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., Crandall, K.A., 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 16, 38–53. doi:10.1016/j.meegid.2013.01.009
- Pérez Pulido, R., Toledo del Árbol, J., Grande Burgos, M.J., Gálvez, A., 2012. Bactericidal effects of high hydrostatic pressure treatment singly or in combination with natural antimicrobials on *Staphylococcus aureus* in rice pudding. *Food Control* 28, 19–24. doi:10.1016/j.foodcont.2012.04.045
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., Pantosti, A., 2015. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health* 109, 309–318. doi:10.1179/2047773215Y.0000000030
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698. doi:10.1111/1574-6976.12030
- Raso, J., Barbosa-Cánovas, G. V., 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 265–285. doi:10.1080/10408690390826527
- Real Decreto 1728/2007, de 17 de enero de 2008, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche. *Boletín Oficial del Estado*. núm. 15, p.3508-3519.
- Real Decreto 1113/2006, de 6 de octubre de 2006, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. *Boletín Oficial del Estado*. núm. 239, p.34717-34720.
- Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K., Whittam, T.S., 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406, 64–67.

## Introducción general y objetivos

- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N.R. de, Sanches-Silva, A., 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* 61, 132–140. doi:10.1016/j.tifs.2016.11.021
- Rivalain, N., Roquain, J., Demazeau, G., 2010. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnol. Adv.* 28, 659–672. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.04.001
- Rivas, L., Mellor, G.E., Gobius, K., Fegan, N., 2015. Detection and typing strategies for pathogenic *Escherichia coli*. Springer, New York. doi:10.1007/978-1-4939-2346-5
- Robins-Browne, R.M., Holt, K.E., Ingle, D.J., Hocking, D.M., Yang, J., Tauschek, M., 2016. Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 1–9. doi:10.3389/fcimb.2016.00141
- Rooney, M.L., 2005. Introduction to active food packaging technologies, in: Han, J. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Elsevier, Amsterdam, pp. 63–79. doi:10.1016/B978-012311632-1/50037-1
- Sabat, A.J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J. m, Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A.W., 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance* 18, 1–15. doi:20380 [pii]
- Sakkas, H., Papadopoulou, C., 2017. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 429–438. doi:10.4014/jmb.1608.08024
- Sanz-Puig, M., Moreno, P., Pina-Pérez, M.C., Rodrigo, D., Martínez, A., 2017. Combined effect of high hydrostatic pressure (HHP) and antimicrobial from agro-industrial by-products against *S. Typhimurium*. *LWT - Food Sci. Technol.* 77, 126–133. doi:10.1016/j.lwt.2016.11.031
- Saxena, T., Kaushik, P., Krishna Mohan, M., 2015. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 82, 249–264. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.015
- Scheutz, F., Strockbine, N.A., 2015. *Escherichia*, in: Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 1–49. doi:10.1002/9781118960608
- Scheutz, F., 2014. Taxonomy meets public health: The case of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–15. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0019-2013.Correspondence
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A.D., 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2951–2963. doi:10.1128/JCM.00860-12

## Introducción general y objetivos

- Singer, A.C., Shaw, H., Rhodes, V., Hart, A., 2016. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Front. Microbiol.* 7, 1–22. doi:10.3389/fmicb.2016.01728
- Soliva-Fortuny, R., Grigelmo-Miguel, N., Barbosa-Cánovas, G. V., Martín-Belloso, O., 2011. Nonthermal processes as hurdles with selected examples, in: Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G. V., Balasubramaniam, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D.F., Yuan, J.T.C. (Eds.), *Nonthermal Processing Technologies for Food*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 406–427. doi:10.1002/9780470958360.ch28
- Stoica, M., Mihalcea, L., Borda, D., Alexe, P., 2013. Non-thermal novel food processing technologies . An overview. *J. Agroaliment. Process. Technol.* 19, 212–217.
- Stratakos, A.C., Delgado-Pando, G., Linton, M., Patterson, M.F., Koidis, A., 2015. Synergism between high-pressure processing and active packaging against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken breast. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 41–47. doi:10.1016/j.ifset.2014.11.005
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Sinniah, U.R., 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2016, 1–21. doi:10.1155/2016/3012462
- Tao, Y., Sun, D.-W., Hogan, E., Kelly, A.L., 2014. High-pressure processing of foods, in: Sun, D.-W. (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier, Oxford, pp. 3–24. doi:10.1016/B978-0-12-411479-1.00001-2
- Torres, A.G., 2016. *Escherichia coli* in the Americas. Springer, Gewerbestrasse. doi:10.1007/978-3-319-45092-6
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2013. Microbial diseases of the digestive system, in: *Microbiology an Introduction*. Pearson, New York, pp. 711–748.
- Vieira, M.A., Gomes, T.A.T., Camargo, C.H., dos Santos, L.F., Hernandez, R.T., Dias, R.C.B., Pinheiro, S.R.S., 2016. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. *J. Med. Microbiol.* 65, 998–1006. doi:10.1099/jmm.0.000313
- Viljanen, M.K., Peltola, T., Kuistila, M., Huovinen, P., Junnila, S., Olkkonen, L., Järvinen, H., 1990. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *Lancet* 336, 831–834. doi:10.1016/0140-6736(90)92337-H
- Villa, T.G., Veiga-Crespo, P., 2014. *Antimicrobial Compounds*. Springer, Berlin. doi:10.1007/978-3-642-40444-3

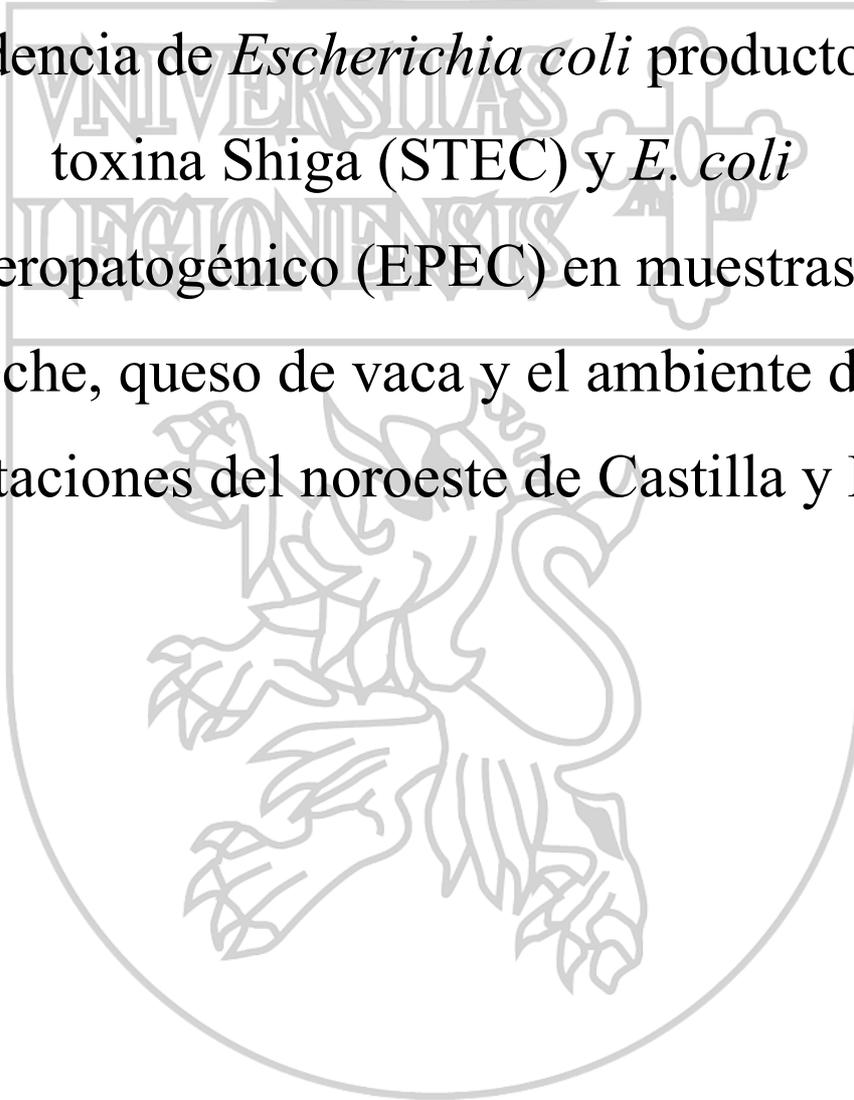
## Introducción general y objetivos

- Vimont, a, Vernozy-Rozand, C., Delignette-Muller, M.-L., 2006. Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 102–108. doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01818.x
- Wang, F., Yang, Q., Kase, J. a, Meng, J., Clotilde, L.M., Lin, A., Ge, B., 2013. Current trends in detecting non-O157 Shiga toxin–producing *Escherichia coli* in food. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 665–677. doi:10.1089/fpd.2012.1448
- Werner, B.G., Koontz, J.L., Goddard, J.M., 2017. Hurdles to commercial translation of next generation active food packaging technologies. *Curr. Opin. Food Sci.* 16, 40–48. doi:10.1016/j.cofs.2017.07.007
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- Yang, S.-C., Lin, C.-H., Aljuffali, I.A., Fang, J.-Y., 2017. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch. Microbiol.* 199, 811–825. doi:10.1007/s00203-017-1393-y
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2033–2039. doi:10.1128/JCM.41.5.2033-2039.2003
- Zaman, S. Bin, Hussain, M.A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K.T., Hossain, N., 2017. A review on antibiotic resistance: Alarm bells are ringing. *Cureus* 9, 1–9. doi:10.7759/cureus.1403





Incidencia de *Escherichia coli* productor de  
toxina Shiga (STEC) y *E. coli*  
enteropatógeno (EPEC) en muestras de  
leche, queso de vaca y el ambiente de  
explotaciones del noroeste de Castilla y León.





## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del grupo patógeno STEC, presentes en el tracto gastrointestinal de una gran diversidad de especies animales, han sido identificadas en mamíferos, aves, anfibios, peces, mariscos e insectos (Amézquita-López et al., 2017). Aunque las STEC no sean específicas de un determinado huésped, se considera que los rumiantes son su principal reservorio (Amézquita-López et al., 2017; Gomes et al., 2016; Hussein y Sakuma, 2005), y en particular el ganado bovino (King et al., 2014). El ganado lechero puede ser reservorio de STEC tanto O157 como no-O157 y puede eliminar en sus heces estas bacterias, contaminando el ambiente de las explotaciones (Caprioli et al., 2005; Hussein y Sakuma, 2005). Las STEC son capaces de sobrevivir en el suelo, las heces, los pastos y el agua, por lo que pueden ser importantes vehículos de transmisión (Gomes et al., 2016). Además, en explotaciones con una alta concentración de animales y un ambiente seco, el aire puede favorecer su circulación en el ambiente (Baker et al., 2016).

Durante y/o después del ordeño se puede producir la contaminación cruzada de la leche con cepas de STEC presentes en el ambiente y las heces de los animales (Baker et al., 2016; Farrokh et al., 2013). En los últimos años, se ha descrito en varios artículos el aislamiento de cepas de STEC a partir de leche cruda de vaca con prevalencias comprendidas en el rango 0-3,2% (Cobbold et al., 2008; Coia et al., 2001; EFSA, 2016; Jayarao et al., 2006; Roopnarine et al., 2007), mientras que en queso elaborado con leche cruda de vaca se han indicado rangos de prevalencia más amplios y comprendidos entre 0 y 21% (Cardoso y Marin, 2017; Coia et al., 2001; Guzmán-Hernández et al., 2016; Stephan et al., 2008; Zweifel et al., 2010).

EPEC es un patotipo perteneciente al grupo de DEC que se caracteriza por la presencia del gen de la intimina (*eae*) y por la ausencia de los genes que codifican para las toxinas Shiga (*stx*). Además, la presencia del plásmido pEAF divide el patotipo en cepas tEPEC, que poseen el pEAF, y cepas aEPEC, que no presentan este plásmido (Pearson et al., 2016). Estos dos grupos de EPEC también se diferencian en cuanto a su reservorio principal: mientras que el único

reservorio de tEPEC son los humanos, las aEPEC pueden tener como reservorio tanto los animales como las personas (Trabulsi et al., 2002).

Cepas de aEPEC han sido aisladas de animales domésticos (perros y gatos) y de producción, como el vacuno, ovino, caprino, porcino y aviar (Hernandes et al., 2009). Las vacas lecheras pueden ser portadoras de aEPEC, eliminando en sus heces estas bacterias que pueden contaminar la leche y el ambiente de la explotaciones (Singh et al., 2015; Trevisani et al., 2013). Varios trabajos presentaron datos sobre el aislamiento de cepas de EPEC en leche cruda de vaca con una prevalencia comprendida entre 3,1 y 27,7% (Adesiyun et al., 1997; Altalhi y Hassan, 2009; Caine et al., 2014; Mohammadi y Abiri, 2013). Wang et al. (2017) estudiaron cepas de aEPEC aisladas de alimentos, cerdos, bovinos y personas sanas y enfermas, constatando que las obtenidas de pacientes enfermos estaban relacionadas con la de los bovinos, reforzando la hipótesis de que estos animales son el principal reservorio de cepas de aEPEC.

Este capítulo tuvo como objetivos (a) determinar la importancia de la leche de vaca y de los quesos madurados producidos en el noroeste de la Comunidad Autónoma de Castilla y León como vehículos de STEC y EPEC, (b) establecer las principales fuentes de contaminación en las explotaciones, utilizando técnicas de aislamiento en placa y basadas en la PCR, y (c) estimar la relación de la calidad higiénico-sanitaria de la leche de vaca y del queso derivado con la incidencia de muestras positivas por STEC o EPEC.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS**

#### **2.1.1. Leche de vaca almacenada en tanque**

En el transcurso del año de 2015, se tomaron asépticamente muestras de 100 ml de leche de tanque de 106 explotaciones del noroeste de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (León, Zamora y Palencia). El estudio fue dividido en dos muestreos, uno en invierno (enero a marzo de 2015) y otro en verano (junio y julio de 2015), sumando un total de 214 muestras de leche analizadas. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio a temperatura de refrigeración (7 °C) en menos de dos horas hasta su procesamiento posterior.

#### **2.1.2. Queso de leche cruda de vaca**

Los quesos analizados fueron fabricados y madurados en la cooperativa VEGAESLA (Toral de los Guzmanes, León) a partir de leche cruda de vaca de explotaciones de la provincia de León que habían sido incluidas en los trabajos descritos en el punto anterior. Se tomaron quesos enteros para su análisis posterior, realizando dos tomas de muestras en días diferentes hasta alcanzar un total de 216 muestras.

El primer muestreo fue realizado en primavera con quesos elaborados a partir de leche obtenida en invierno y con un rango de maduración de 64-116 días (n=108). El segundo muestreo fue realizado en otoño con quesos elaborados a partir de leche obtenida en verano y con un rango de maduración de 72-82 días (n=108). Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio a temperatura de refrigeración (7 °C) en menos de una hora hasta su procesamiento posterior.

### 2.1.3. Ambiente de las explotaciones

En función de los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de leche de tanque, se seleccionaron cinco explotaciones que fueron positivas para alguno de los genes investigados (*stx1*, *stx2* y *eae*). En las explotaciones elegidas se tomaron las siguientes muestras: aire (n=10), agua (n=15), pienso (n=15), heces (n=15), manos de los operarios de granja (n=10) y filtro de las ordeñadoras (n=7). Los muestreos se realizaron en dos épocas distintas, en invierno (marzo de 2016) y en verano (finales de junio de 2016), con los procedimientos siguientes:

- Aire: se utilizó el muestreador de aire Microbio Air Sampler MB1 (FW Parrett Ltd., Londres, Reino Unido), ajustado para tomar 100 l de aire durante un minuto. En cada explotación, dos placas de 90 mm de agar Sorbitol MacConkey (SMAC, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) fueron expuestas al aire de la explotación durante cinco minutos e incubadas a 37 °C durante 24 horas.
- Agua: se tomaron dos muestras (250 ml) de agua de bebida de los animales, en recipientes de vidrios previamente esterilizados.
- Heces: Las camas de los animales fueron muestreadas utilizando dos pares de calcetines estériles de PVC por explotación y llevando a cabo al menos 100 pasos con cada par de calcetín. Una vez terminado el muestreo, se depositaron los calcetines en bolsas estériles.
- Pienso: se tomaron muestras aleatorias del pienso (200 g por explotación) en bolsas estériles.
- Operario de granja: fueron muestreadas las dos manos de los operarios con un hisopo, previamente humedecido en *Tryptone Soya Broth* con 0,6% de *Yeast Extract* (TSB-YE, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), y luego este fue almacenado en el propio líquido diluyente (10 ml) para su transporte al laboratorio.
- Filtro de la ordeñadora: para cada explotación, fue recogido el filtro del ordeño del día y almacenado asépticamente en bolsas estériles.

Al igual que para las muestras de leche, todas se transportaron al laboratorio a temperatura de refrigeración en menos de dos horas hasta su procesado.

## 2.2.PREPARACIÓN DE CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO NO SELECTIVOS DE LAS MUESTRAS

Se realizó un enriquecimiento previo de todas las muestras tomadas. Para ello, se utilizó el caldo TSB-YE incubándose a 42 °C durante 18 horas. El procedimiento fue distinto para cada tipo de muestra y se detalla a continuación:

- Leche de tanque: se mezclaron 50 ml de la muestra de leche con 450 ml del medio de enriquecimiento.
- Queso: se pesaron 25 g de queso que se añadieron a 225 ml del enriquecimiento y se homogeneizaron durante dos minutos.
- Agua: se filtraron 250 ml del agua de cada explotación a través de filtros de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm. Estos fueron sumergidos en 50 ml del medio de enriquecimiento.
- Heces: los dos pares de calcetines de cada explotación fueron introducidos en una bolsa con 450 ml del líquido de enriquecimiento y se homogeneizaron durante un minuto y medio.
- Pienso: se homogeneizaron 25 g del pienso en 225 ml de caldo de enriquecimiento durante un minuto y medio.
- Operario: los hisopos junto con su medio de transporte fueron mezclados con 225 ml del caldo de enriquecimiento.
- Filtro de la ordeñadora: los filtros fueron sumergidos en 225 ml del medio de enriquecimiento y se homogeneizó durante un minuto y medio.

## 2.3.DETECCIÓN DE LOS GENES *stx1*, *stx2* Y *eae* EN LOS ENRIQUECIMIENTOS DE LAS MUESTRAS

En todas las muestras se llevó a cabo la técnica PCR para la detección de los genes que codifican para las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*) y para la

intimina (*eae*). Para ello, se tomó 1 ml de cada uno de los enriquecimientos y se centrifugó (13.000 g durante tres minutos) para obtener un “pellet” o sedimento. A continuación, este se resuspendió en *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Amresco, Solon, Ohio, EE.UU.) y se volvió a centrifugar descartando el sobrenadante. Este lavado se repitió dos veces, y finalmente se resuspendió el “pellet” resultante en una solución acuosa que contenía Triton X-100 (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) al 1% y Chelex 100 Resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) al 2%. Para la extracción del ADN, las muestras se sometieron a un tratamiento de 100 °C durante 15 minutos, se enfriaron durante cinco minutos y finalmente fueron centrifugadas a 13.000 g durante tres minutos.

Se realizó una PCR múltiple para detectar los genes *stx1* y *stx2* utilizando los cebadores específicos a una concentración de 750 nM para la detección del gen *stx1* (Pollard et al., 1990) y 250 nM para la detección del gen *stx2* (Olsen et al., 1995), y otra PCR para detectar el gen *eae* utilizando los cebadores correspondientes a una concentración de 250 nM (Paton y Paton, 1998), según se recoge en la Tabla I.1. La amplificación de estos genes se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con las condiciones que se detallan en la Tabla I.2.

El producto de la PCR fue sometido a una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% conteniendo el compuesto RedSafe™ 0,005% (Intron Biotechnology, Inc., Corea) en Tris-Acetic-EDTA (TAE) y posteriormente se observaron los resultados exponiendo el gel a luz ultravioleta en un transiluminador. Se fotografió el gel empleando el sistema de documentación de geles Digimage System acoplado a una cámara digital Canon Power Shot G11.

**Tabla I.1.** Cebadores utilizados en la técnica de PCR para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* en los enriquecimientos de las muestras de origen vacuno.

<b>Diana</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 5`- 3`</b>	<b>Tamaño (pb)<sup>1</sup></b>	<b>Referencia</b>
<i>stx1</i>	stx1F	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	(Pollard et al., 1990)
	stx1R	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
<i>stx2</i>	stx2F	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	478	(Olsen et al., 1995)
	stx2R	GGATGCATCTCTGGTCATTG		
<i>eae</i>	eaeF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	(Paton y Paton, 1998)
	eaeR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		

<sup>1</sup>pb: Pares de bases

**Tabla I.2.** Condiciones de la PCR para la amplificación de los genes *stx1*, *stx2* y *eae*.

<i>stx1</i> y <i>stx2</i>					
<b>Etapa</b>	<b>Desnaturalización inicial</b>	<b>25 ciclos</b>			<b>Elongación final</b>
		<b>Desnaturalización</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Elongación</b>	
<b>Temperatura</b>	95°C	95°C	56°C	72°C	72°C
<b>Tiempo</b>	5 minutos	30 segundos	40 segundos	1 minuto	1,5 minutos
<i>eae</i>					
<b>Etapa</b>	<b>Desnaturalización inicial</b>	<b>30 ciclos</b>			<b>Elongación final</b>
		<b>Desnaturalización</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Elongación</b>	
<b>Temperatura</b>	94°C	92°C	59°C	72°C	72°C
<b>Tiempo</b>	3 minutos	30 segundos	30 segundos	1 minuto	1,5 minutos

## 2.4.OBTENCIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS

Para la obtención de aislados de los grupos patógenos estudiados, los enriquecimientos que resultaron positivos para los genes investigados fueron sembrados en dos placas de agar SMAC. Tras una incubación a 37 °C durante 24 horas, con un asa estéril se tomaron aleatoriamente cinco colonias, que presentaban la morfología característica de *E. coli* en este medio, formando a continuación un conjunto o “mix” de colonias (cuatro “mixes” por muestra de 5 colonias cada uno). Los “mixes” fueron sometidos a PCR para buscar los genes *stx1*, *stx2* y *eae* con las mismas condiciones anteriormente descritas. En los “mixes” que se observaron resultados positivos para alguno de los genes investigados, las colonias eran investigadas individualmente por PCR. Los aislados positivos para uno o varios genes fueron sembrados en agar SMAC, incubando las placas a 37 °C durante 24 horas, para su conservación a -30 °C en viales de almacenamiento CryoInstant® (Scharlau, Barcelona, España) hasta su posterior caracterización.

## 2.5.MICROORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE

### 2.5.1. Determinación de microorganismos aerobios mesófilos en las muestras de leche

Se realizó una estimación de la calidad higiénico-sanitaria de la leche mediante la enumeración de los microorganismos aerobios mesófilos. Para ello, se realizaron diluciones decimales en agua peptona bacteriológica al 0,1% y posterior siembra de 100 µl en superficie sobre placas de *Plate Count Agar* (PCA, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), que fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas.

### 2.5.2. Determinación de microorganismos coliformes totales y *E. coli* en muestras de queso

La cuantificación de coliformes totales y *E. coli* fue realizada en láminas de siembra Petrifilm EC de acuerdo con las instrucciones del fabricante (3M Microbiology, St Paul, MN, EE.UU.). Las láminas Petrifilm fueron incubadas a 37 °C durante 24-48 horas. Las colonias rojas con burbujas fueron enumeradas como coliformes totales, mientras que las azules con burbujas fueron consideradas como *E. coli*. El volumen de muestra fue de 1 ml y la dilución mínima de inoculación fue la 10<sup>-1</sup>, por lo que el límite de detección se estableció en 10 ufc/ml.

## 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los recuentos microbianos (aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*) fueron transformados a unidades logarítmicas y tratados estadísticamente (valores promedios, desviación estándar y prueba *t-Student*) para determinar la relación entre los recuentos y la detección de muestras positivas para cada grupo patógeno de *E. coli* investigado.

Se llevó a cabo una prueba chi-cuadrado para determinar la asociación entre la estación (verano/inverno) en la que se tomaron las muestras y la obtención de resultados positivos para alguno de los grupos patógenos de *E. coli* estudiados, llevando a cabo la prueba con un p= 0,01.

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. INCIDENCIA DE STEC EN LECHE DE VACA Y EN EL AMBIENTE DE EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO

Los resultados obtenidos de la investigación de los genes asociados a STEC y EPEC en muestras del hábitat vacuno se presentan en la Tabla I.3. Fueron analizadas un total de 502 muestras de leche, queso y del ambiente de explotaciones de vacuno lechero procedentes del noroeste de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (León, Palencia y Zamora). El 16,1% (81/502) de los enriquecimientos fue positivo para alguno de los genes *stx*, pero solo fue posible aislar cepas de STEC en el 2,4% de las muestras (12/502, Tabla I.3).

**Tabla I.3.** Prevalencia de los genes *stx* y *eae* en enriquecimientos no selectivos y de muestras positivas para STEC o EPEC en leche de vaca, queso y el ambiente de explotaciones de vacuno lechero del noroeste de Castilla y León.

Muestras (n)	% Enriquecimientos (n)		% Muestras positivas <sup>1</sup> (n)	
	<i>stx</i> <sup>+</sup> y <i>eae</i> <sup>+/-</sup>	<i>eae</i> <sup>+</sup>	STEC ( <i>stx</i> <sup>+</sup> )	EPEC ( <i>stx</i> / <i>eae</i> <sup>+</sup> )
Leche (214)	27,6 (59)	30,8 (66)	2,3 (5)	6,1 (13)
Queso (216)	0,5 (1)	N.D. <sup>2</sup>	N.D.	N.D.
<b>Muestras ambientales</b>				
Heces (15)	53,3 (8)	6,7 (1)	13,3 (2)	33,3 (5)
Operarios (10)	40,0 (4)	N.D.	20,0 (2)	N.D.
Filtros (7)	42,9 (3)	14,3 (1)	N.D.	N.D.
Agua (15)	6,7 (1)	N.D.	N.D.	N.D.
Pienso (15)	20,0 (3)	20,0 (3)	6,7 (1)	6,7 (1)
Aire (10)	20,0 (2)	N.D.	20,0 (2)	N.D.
<b>Total (502)</b>	<b>16,1 (81)</b>	<b>14,14 (71)</b>	<b>2,4 (12)</b>	<b>3,8 (19)</b>

<sup>1</sup>Se consideraron muestras positivas en las que fue posible aislar cepas STEC y/o EPEC.

<sup>2</sup>N.D., no detectado

En la Figura I.1 se presenta la localización geográfica de las explotaciones de ganado vacuno lechero que se estudiaron, distribuidas en el cuadrante noroeste de Castilla y León (León, Palencia y Zamora).

**Figura I.1.** Distribución geográfica de las explotaciones de vacuno lechero muestreadas para la investigación de STEC y/o EPEC.



El uso de distintas metodologías para la detección y el aislamiento de STEC en queso y leche no permite que los datos de la literatura científica sean siempre comparables. En este estudio, se detectó la presencia de los genes *stx* en el 27,6% (59/214, Tabla I.3) de los enriquecimientos de leche estudiados. Esta incidencia fue superior a la detectada en EE.UU. (15,2%) por Van Kessel et al. (2011), Francia (15,0%) por Raynaud et al. (2005) y en el norte

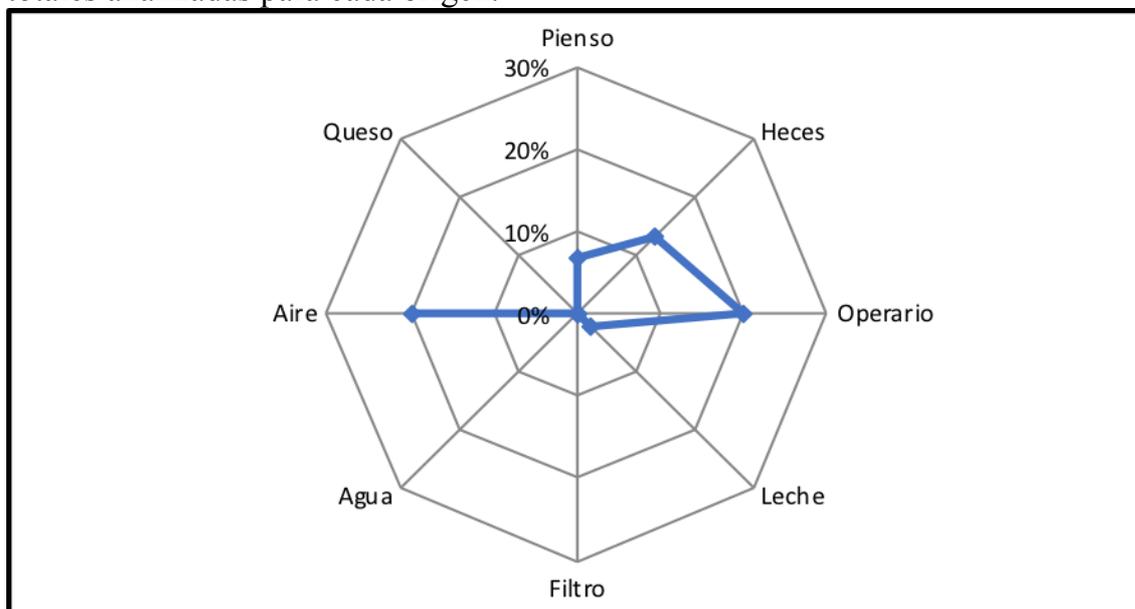
de Italia (12,5%) por Trevisani et al. (2014). Sin embargo, Lynch et al. (2012) encontraron una incidencia mayor en Irlanda (36,0%).

Teniendo en cuenta las muestras de leche cruda en las que se aislaron cepas de STEC, el 2,3% (5/214) fueron positivas (Tabla I.1). Este porcentaje es muy similar al 1,8, 3,6 y 2,3% indicado por la *European Food Safety Authority* (EFSA) en la UE en los años 2015, 2014 y 2013, respectivamente (EFSA, 2016, 2015a, 2015b). Los operarios (20%; 2/10), el aire (20%; 2/10), las heces (13,33%; 2/15) y el pienso (6,7%; 1/15) se mostraron como fuentes de contaminación por STEC. Entre estas fuentes ambientales, destacan como portadores de STEC los operarios y el aire cuya incidencia fue comparable a la presentada en las heces del ganado (Figura I.2). Estos datos muestran una amplia distribución de las cepas de STEC en las explotaciones y, por tanto, la importancia del ambiente en la posible contaminación cruzada de la leche de vaca.

Por otro lado, el pienso de los animales no es considerado una fuente importante de contaminación por STEC, aunque es posible que ocurra la contaminación a través de los propios comederos (Berry y Wells, 2010). Nuestros resultados parecen corroborar esta observación ya que solo se detectó una muestra positiva (6,7%).

No se aislaron cepas de STEC en las muestras del filtro de la ordeñadora (0/7), del agua (0/15) ni del queso (0/216) conforme a como se puede observar en la distribución gráfica presentada en la Figura I.2. Debe resaltarse que aunque no fue aislada ninguna cepa de STEC en las muestras de agua, otros investigadores sí identificaron este origen como una fuente importante de contaminación por STEC (Berry y Wells, 2010; LeJeune et al., 2001; Renter et al., 2005). Del mismo modo, a pesar del alto número de muestras estudiadas ( $n = 216$ , Tabla I.3), todas las muestras de queso elaborado con leche cruda fueron negativas para STEC. Como fue revisado por Farrokh et al. (2013), la mayoría de los estudios realizados en Europa sobre la prevalencia de STEC en queso se llevaron a cabo en menos de 100 muestras, mostrando prevalencias dispares que oscilaron entre muy bajas (0,48%) y relativamente altas (13,1%).

**Figura I.2.** Distribución de muestras positivas para STEC obtenidas de diferentes orígenes en explotaciones de vacuno lechero de Castilla y León. Cada valor muestra el porcentaje de muestras positivas en relación a las muestras totales analizadas para cada origen.



Los miembros del grupo STEC son *E. coli* que producen toxinas Stx1 y/o Stx2 y, aparte del serotipo O157:H7 de alta virulencia, otros serogrupos no-O157 son cada vez más reconocidos como importantes patógenos transmitidos por los alimentos en todo el mundo (Farrokh et al., 2013; Gould et al., 2013; Scallan et al., 2011). Los rumiantes son un reservorio primario de STEC, especialmente el ganado vacuno, entre un gran número de especies animales (Persad y LeJeune, 2014). Su presencia en el medio ambiente es motivo de preocupación ya que favorece su diseminación y posterior contaminación de los alimentos debido a su capacidad de supervivencia (Gomes et al., 2016). Además, los animales contribuyen a la diseminación de STEC entre las explotaciones y se ha visto ligada a los altos niveles de estos microorganismos excretados con las heces (Baker et al., 2016). A pesar del número limitado de muestras de heces analizadas en nuestro trabajo, la prevalencia de STEC en las camas del ganado (13,3%) fue similar a la registrada por Blanco et al. (1998) en heces de vacuno en España. Otros estudios muestran un amplio rango de prevalencia (0,4%-82,0%) en heces de este ganado (Aidar-Ugrinovich et al., 2007; Cerqueira et al., 1999; Hussein y Sakuma, 2005). La diferente metodología de muestreo puede ser una

razón que explique tanta variabilidad. En nuestro trabajo muestreamos una mezcla de paja y heces, tanto frescas como antiguas, de la zona de descanso de cada explotación, mientras que en otros trabajos el muestreo se llevó a cabo en heces recién evacuadas o en heces frescas, que explicaría valores de prevalencia mayores.

En la Tabla I.4 se muestra la distribución de los enriquecimientos positivos de las muestras en las estaciones de invierno y verano para los genes determinantes de los grupos patógenos STEC y EPEC. Se realizó una prueba de asociación de chi-cuadrado para determinar si había una relación entre los enriquecimientos positivos para los genes investigados y la estación de muestreo. La prueba de chi-cuadrado ( $X^2=23,108$ ,  $df=1$ ,  $p<0,01$ ) parece apoyar esa asociación. Hemos observado que el 58,0% de los enriquecimientos positivos para algunos de los genes *stx* fueron obtenidos de muestras del período de invierno ( $p < 0,01$ ).

**Tabla I.4.** Distribución de los genes *stx* y/o *eae* en los enriquecimientos positivos de muestras obtenidas en explotaciones de vacuno lechero de Castilla y León en los periodos de invierno y verano.

Genotipo (n) <sup>1</sup>	Invierno				Verano			
	%Leche	%Queso	%Ambiental	%Total	%Leche	%Queso	%Ambiental	%Total
<i>stx</i> <sup>+</sup> y <i>eae</i> <sup>+/±</sup> (81)	46,9 (38)	N.D. <sup>2</sup>	11,1 (9)	58,0 (47)	25,9 (21)	1,3 (1)	14,8 (12)	42,0 (34)
<i>eae</i> <sup>+</sup> (71)	18,3 (13)	N.D.	1,4 (1)	19,7 (14)	74,7 (53)	N.D.	5,6 (4)	80,3 (57)

<sup>1</sup> (n), número de enriquecimientos positivos para cada origen.

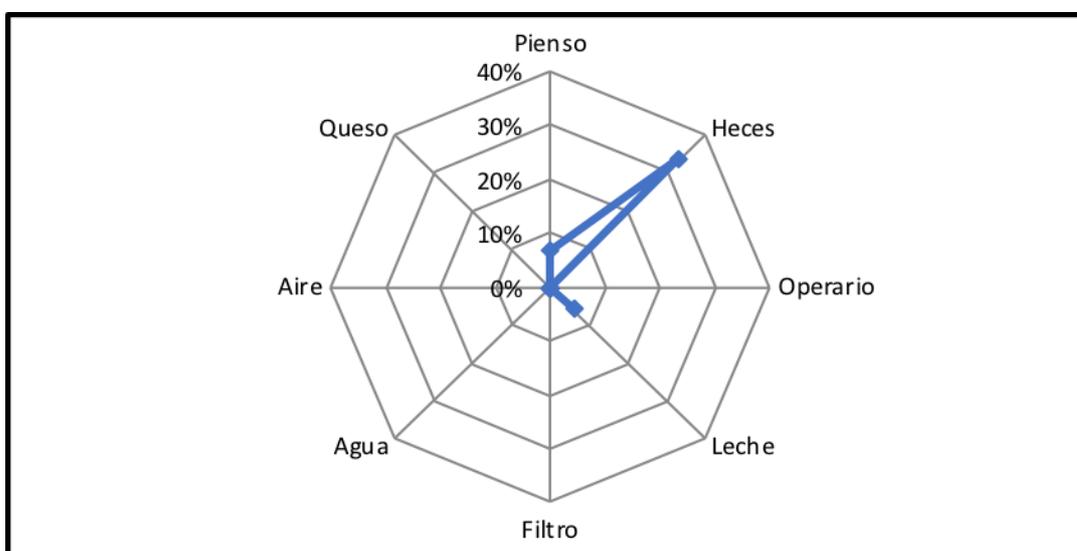
<sup>2</sup> N.D., no detectado.

Teniendo en cuenta las muestras positivas, confirmadas con el aislamiento de cepas STEC, no se encontró una tendencia estacional similar ( $p > 0,01$ ) a pesar de que el 58,3% de las muestras positivas también se obtuvieron en invierno. Estos resultados contrastan con los de infecciones humanas por STEC en la UE entre 2009 y 2013, período en el que se observó una tendencia estacional clara con altos picos en el verano (EFSA, 2015a). También se describió una relación idéntica en EE.UU. con picos de infecciones por STEC no-O157 en verano durante el período 2000-2005 (Eblen, 2007).

### 3.2. INCIDENCIA DE EPEC EN LECHE DE VACA Y EN EL AMBIENTE DE EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO

Entre un total de 502 caldos de enriquecimiento de muestras de origen vacuno obtenidas de explotaciones de la franja noroeste de Castilla y León (Figura I.1), el 14,1 % (71/502) fueron *stx*<sup>-</sup>/*ea**e*<sup>+</sup> según los datos presentados en la Tabla I.3. El porcentaje de muestras positivas confirmadas mediante aislamiento de cepas EPEC fue mucho más bajo (3,8%, 19/502). Sobre el estudio de 214 muestras de leche cruda de vaca, en 13 (6,1%) fue posible el aislamiento de cepas EPEC y, por lo tanto, se consideraron muestras positivas. Con respecto a las muestras ambientales, el 33,3% de las muestras de heces (5/15) y el 6,7% (1/15) de las muestras de pienso fueron positivas. En las muestras de queso (0/216), filtro de la ordeñadora (0/7), aire (0/10), agua de bebida (0/15) y operarios (0/10) no se aisló ninguna cepa de EPEC según se puede observar en la distribución gráfica de muestras positivas presentada en la Figura I.3. Los caldos de enriquecimientos obtenidos a partir de estos orígenes ambientales fueron también negativos para el gen de la intimina (*ea**e*), a excepción de uno obtenido a partir del filtro de ordeñadora.

**Figura I.3.** Distribución de muestras positivas para EPEC obtenidas de diferentes orígenes en explotaciones de vacuno lechero de Castilla y León. Cada valor muestra el porcentaje de muestras positivas en relación a las muestras totales analizadas para cada origen.



La prueba de chi-cuadrado determinó una relación significativa ( $p < 0,01$ ) entre los enriquecimientos positivos para el gen *eae*, y negativos para los genes *stx*, y la estación de muestreo. Se observa en la Tabla I.4. que, globalmente, el 80,3% de los enriquecimientos *eae*<sup>+</sup> se obtuvieron en el período de verano. Cuando las muestras fueron confirmadas mediante el aislamiento de cepas EPEC, no se encontró una tendencia estacional similar ( $p > 0,01$ ) aunque el 66,7% de las muestras positivas también se obtuvieron en verano.

Muchos estudios se han ocupado del aislamiento de cepas EPEC, entre otras *E. coli* causantes de diarreas, en un gran número de orígenes, tales como diferentes especies de animales y muestras de alimentos, que incluyen el ganado vacuno y la leche de vaca. Sin embargo, los datos que informan de la prevalencia de EPEC en muestras de leche de vaca o queso fabricado a partir de leche de vaca son limitados y a la vez dispares. Así, la prevalencia de EPEC en muestras de leche cruda fue del 9,1% en Arabia Saudita (Altalhi y Hassan, 2009), solo del 0,45% en Egipto (Ombarak et al., 2016), y del 14,7% en leche de oveja en España (Otero et al., 2013), mientras que en nuestro trabajo la incidencia de EPEC alcanzó el 6,1% de las muestras de leche de vaca (Tabla I.3).

Por otro lado, la proporción de EPEC en dos tipos de quesos tradicionales en la República Eslovaca, producidos a partir de leche cruda de oveja, fue del 3,1% (Holko et al., 2006) y del 3% en muestras de quesos tiernos en Brasil (Gonzalez et al., 2000). Nuestros resultados mostraron que ninguna de las 216 muestras de queso de leche de vaca cruda resultaron EPEC<sup>+</sup>, siendo también negativa la detección del gen *eae* en sus correspondientes enriquecimientos, sugiriendo una alta efectividad del proceso de fabricación del queso en el control de estos patógenos, especialmente condicionado por la duración de la etapa de maduración, que fue superior a los dos meses, y probablemente por la utilización de conservadores.

A pesar del número limitado de muestras analizadas de heces de vaca en este estudio ( $n=15$ ), la ocurrencia de muestras positivas confirmadas (33,3%) es muy semejante al 32% que Singh et al. (2015) indicaron en muestras de ganado lechero. Estos datos son mucho más altos que los citados en otros estudios, con

prevalencias variables entre 2,6 a 9,0% (Aidar-Ugrinovich et al., 2007; Bolton et al., 2014; Orden et al., 2002; Saridakis et al., 1997), con lo que destacan a las heces como vehículo de transmisión de EPEC entre los animales y de potencial contaminación de la leche de vaca.

### 3.3.CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LECHE Y QUESO DE VACA

Según el Reglamento nº 853 del año 2004 del Parlamento Europeo y del Consejo (Reglamento (CE) nº 853, 2004), que establece las condiciones específicas de higiene de los alimentos de origen animal, la leche cruda de vaca debería presentar un recuento máximo de colonias de gérmenes a 30 °C de 5 log ufc/ml. Aunque en nuestro estudio el promedio de los recuentos de microorganismos aerobios mesofilos fue de  $4,6 \pm 0,6$  log ufc/ml, un 19,6% (42/214) de las muestras analizadas excedieron el límite máximo de la anterior normativa europea. El análisis estadístico no reveló diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre los recuentos de microorganismos aerobios mesofilos obtenidos en las muestras de leche no mostrando, por tanto, relación de este indicador de calidad higiénica con el aislamiento ni de STEC ni de EPEC.

Los coliformes totales se utilizan con frecuencia para predecir las condiciones higiénico-sanitaria de los alimentos y las instalaciones donde se fabrican los productos lácteos (Trmčić et al., 2016). Se detectó la presencia de coliformes ( $>1$  log ufc/ml) en el 77,3% de las muestras de queso, con una media de  $1,8 \pm 0,9$  log ufc/ml. En Japón, EE.UU. y Brasil la prevalencia de coliformes ( $>1$  log ufc/ml) en quesos elaborados con leche cruda fue inferior a nuestros resultados, con una frecuencia de 20, 42 y 53%, respectivamente (Esho et al., 2013; Perin et al., 2017; Trmčić et al., 2016). El Reglamento de la Comisión Europea nº 2073 del año 2005 (Reglamento (CE) nº 2073, 2005) establece para quesos elaborados con leche pasteurizada el valor máximo de *E. coli* de 3 log ufc/g. Todos los quesos evaluados, aún siendo obtenidos a partir de leche cruda, presentaron recuentos inferiores a los máximos recogidos en la

legislación, detectándose la presencia de *E. coli* (>1 log ufc/ml) en solo el 7,4% (16/216) de las muestras de queso. Ya que esta bacteria es considerada un preciso indicador de contaminación fecal (Paruch y Mæhlum, 2012), los quesos investigados presentaban una adecuada calidad higiénico-sanitaria, con bajos índices de contaminación fecal, que se relacionaron con la nula incidencia de muestras de queso portadoras de STEC o EPEC.

#### 4. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES

Este capítulo muestra que, aunque la incidencia de los genes *stx* fue elevada en los enriquecimientos de origen vacuno (16,1%), el número de muestras en las que fue posible el aislamiento de cepas de STEC fue bastante menor (2,4%), similar a los datos comúnmente citados en la bibliografía científica, y mayoritariamente procedentes del periodo de invierno. El ambiente de las explotaciones, principalmente los operarios y el aire además de las heces contenidas en las camas de los animales, son un vehículo de cepas de STEC que pueden contaminar la leche y consecuentemente estar presentes en los productos derivados.

La incidencia general de muestras positivas para EPEC de origen vacuno lechero fue del 3,8%, alcanzando el 6,1% del total de muestras de leche de vaca analizadas, lo que confirmaría una contaminación relativamente alta por EPEC, que mayoritariamente se detectó en muestras del periodo de verano. Nuestros resultados solo apuntan a las heces contenidas en las camas de los animales como una fuente ambiental importante de contaminación de la leche por este patotipo.

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos muestra una calidad higiénico-sanitaria de la leche de vaca aceptable en términos generales que no se pudo asociar a la incidencia de muestras positivas para STEC o EPEC. Al contrario, la alta calidad higiénico-sanitaria de los quesos investigados, determinada por los niveles de coliformes totales y de *E. coli* situados muy por debajo de los límites legales en la UE, se relaciona con una nula incidencia de muestras de queso positivas para los grupos patógenos de *E. coli* estudiados.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Adesiyun, A.A., Webb, L.A., Romain, H., Kaminjolo, J.S., 1997. Prevalence and characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from milk and feces of cows on dairy farms in Trinidad. *J. Food Prot.* 60, 1174–1181.
- Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J.E., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D.L., Silveira, W.D., Pestana de Castro, A.F., 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 297–306. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.046
- Altalhi, A.D., Hassan, S.A., 2009. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food Control* 20, 913–917. doi:10.1016/j.foodcont.2009.01.005
- Amézquita-López, B.A., Soto-Beltrán, M., Lee, B.G., Yambao, J.C., Quiñones, B., 2017. Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* doi:10.1016/j.jmii.2017.07.004
- Baker, C.A., Rubinelli, P.M., Park, S.H., Carbonero, F., Ricke, S.C., 2016. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. *Food Control* 59, 407–419. doi:10.1016/j.foodcont.2015.06.011
- Berry, E.D., Wells, J.E., 2010. *Escherichia coli* O157:H7: Recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment, in: *Advances in Food and Nutrition Research*. pp. 67–117. doi:10.1016/S1043-4526(10)60004-6
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J., Gutierrez, A., 1998. VETEC infections in cattle and humans (Letter). *Notiz. Inst. Sup. Sanitá* 11, 2–4.
- Bolton, D.J., Ennis, C., McDowell, D., 2014. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from twelve bovine farms in the north-east of Ireland. *Zoonoses Public Health* 61, 149–156. doi:10.1111/zph.12058
- Caine, L.-A., Nwodo, U., Okoh, A., Ndip, R., Green, E., 2014. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw cow's milk from two commercial dairy farms in the eastern Cape Province, South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 11950–11963. doi:10.3390/ijerph111111950
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 289–311. doi:10.1051/vetres:2005002

- Cardoso, P., Marin, J.M., 2017. Occurrence of non-O157 Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* in artisanal mozzarella cheese in Brazil: risk factor associated with food workers. Food Sci. Technol. 37, 41–44. doi:10.1590/1678-457x.06316
- Cerqueira, a M., Guth, B.E., Joaquim, R.M., Andrade, J.R., 1999. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. Vet. Microbiol. 70, 111–121.
- Cobbold, R.N., Davis, M.A., Rice, D.H., Szymanski, M., Tarr, P.I., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2008. Associations between bovine, human, and raw milk, and beef isolates of non-O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* within a restricted geographic area of the United States. J. Food Prot. 71, 1023–1027.
- Coia, J.E., Johnston, Y., Steers, N.J., Hanson, M.F., 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. Int. J. Food Microbiol. 66, 63–69. doi:10.1016/S0168-1605(00)00490-6
- Eblen, D.R., 2007. Public health importance of non-O157 Shiga toxin- producing *Escherichia coli* ( non-O157 STEC ) in the US food supply [WWW Document]. URL [https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/9e41f955-a919-44fb-98b7-9e2218805ecf/STEC\\_101207.pdf?MOD=AJPERES](https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/9e41f955-a919-44fb-98b7-9e2218805ecf/STEC_101207.pdf?MOD=AJPERES) (accessed 12.13.17).
- EFSA, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J. 14, 1–231. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- EFSA, 2015a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J. 13, 1–191. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329
- EFSA, 2015b. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J. 13, 1–165. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991
- Esho, F.K., Enkhtuya, B., Kusumoto, A., Kawamoto, K., 2013. Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan. Biomed Res. Int. 2013, 5–10. doi:10.1155/2013/205801
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., Cerf, O., 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. Int. J. Food Microbiol. 162, 190–212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008

## Capítulo I. Incidencia de STEC y EPEC en leche de vaca y el hábitat vacuno

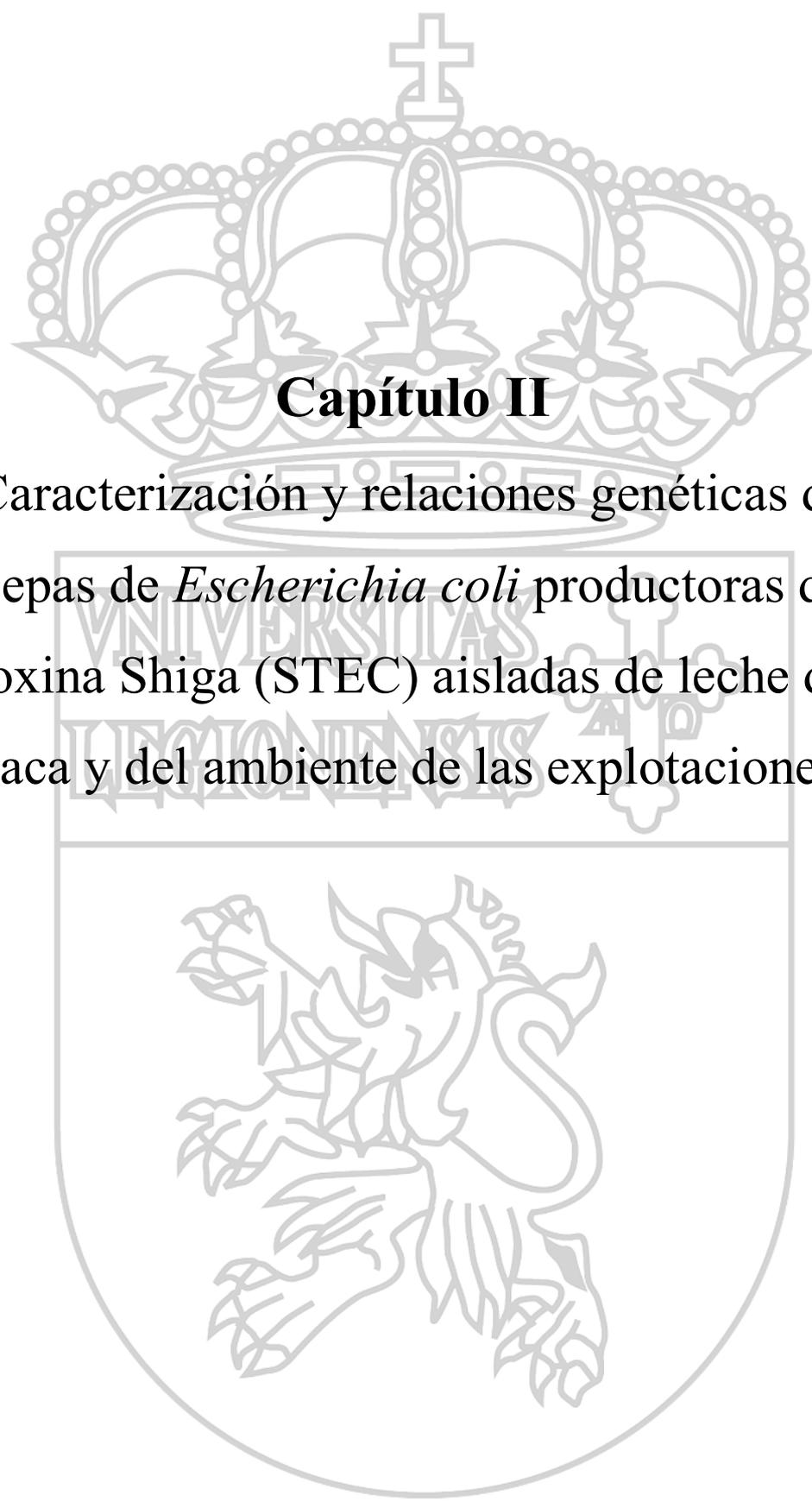
- Gomes, T.A.T., Elias, W.P., Scaletsky, I.C.A., Guth, B.E.C., Rodrigues, J.F., Piazza, R.M.F., Ferreira, L.C.S., Martinez, M.B., 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian J. Microbiol. 47, 3–30. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015
- Gonzalez, A.G., Rosa, A.C., Andrade, J.R., Tibana, A., 2000. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. Food Microbiol. 17, 321–328. doi:10.1006/fmic.1999.0320
- Gould, L.H., Mody, R.K., Ong, K.L., Clogher, P., Cronquist, A.B., Garman, K.N., Lathrop, S., Medus, C., Spina, N.L., Webb, T.H., White, P.L., Wymore, K., Gierke, R.E., Mahon, B.E., Griffin, P.M., 2013. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. Foodborne Pathog. Dis. 10, 453–460. doi:10.1089/fpd.2012.1401
- Guzmán-Hernández, R., Contreras-Rodríguez, A., Hernández-Vélez, R., Pérez-Martínez, I., López-Merino, A., Zaidi, M.B., Estrada-García, T., 2016. Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella* spp., non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. Int. J. Food Microbiol. 237, 10–16. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.018
- Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A.M., Gomes, T.A.T., 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 297, 137–149. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x
- Holko, I., Bisova, T., Holkova, Z., Kmet, V., 2006. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. Food Control 17, 393–396. doi:10.1016/j.foodcont.2005.01.007
- Hussein, H.S., Sakuma, T., 2005. Invited Review: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. J. Dairy Sci. 88, 450–465. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72706-5
- Jayarao, B.M., Donaldson, S.C., Straley, B.A., Sawant, A.A., Hegde, N. V, Brown, J.L., 2006. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. J. Dairy Sci. 89, 2451–2458. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72318-9
- King, N., Lake, R., Cressey, P., Hudson, A., 2014. Risk profile: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk [WWW Document]. URL <http://www.mpi.govt.nz/news-resources/publications.aspx%0A©> (accessed 12.13.17).
- LeJeune, J.T., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. Appl. Environ. Microbiol. 67, 3053–3057. doi:10.1128/AEM.67.7.3053-3057.2001

- Lynch, M.J., Fox, E.M., O'Connor, L., Jordan, K., Murphy, M., 2012. Surveillance of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Irish bovine dairy herds. *Zoonoses Public Health* 59, 264–271. doi:10.1111/j.1863-2378.2011.01443.x
- Mohammadi, P., Abiri, R., 2013. Isolation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from raw milk in Kermanshah by polymerase chain reaction (PCR). *Jundishapur J. Microbiol.* 6, 1–4. doi:10.5812/jjm.5439
- Olsen, J., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P., Popovic, T., Rasmussen, H., Olsvik, Ø., 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 1–78. doi:10.1016/0168-1605(94)00159-4
- Omarak, R.A., Hinenoya, A., Awasthi, S.P., Iguchi, A., Shima, A., Elbagory, A.-R.M., Yamasaki, S., 2016. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.* 221, 69–76. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.009
- 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 necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *J. Appl. Microbiol.* 93, 29–35. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01649.x
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5864–5869. doi:10.1128/AEM.01809-13
- Paruch, A.M., Mæhlum, T., 2012. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecol. Indic.* 23, 140–142. doi:10.1016/j.ecolind.2012.03.026
- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598–602.
- Pearson, J.S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., Hartland, E.L., 2016. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu. Rev. Genet.* 50, 493–513. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035138
- Perin, L.M., Savo Sardaro, M.L., Nero, L.A., Neviani, E., Gatti, M., 2017. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. *Food Microbiol.* 65, 160–169. doi:10.1016/j.fm.2017.02.005

## Capítulo I. Incidencia de STEC y EPEC en leche de vaca y el hábitat vacuno

- Persad, A.K., LeJeune, J.T., 2014. Animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Microbiol. Spectr. 2, 1–14. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014
- Pollard, D.R., Johnson, W.M., Lior, H., Tyler, S.D., Rozee, K.R., 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28, 540–545.
- Raynaud, S., Boscher, P., Picant, P., Mathieu, B., Degand, C., Poutrel, B., Heuchel, V., Chatelin, Y., Vernozzy-Rozand, C., 2005. Prévalence, origine, circulation et persistance des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins français. Renc. Rech. Ruminants 12, 379–382.
- Reglamento (CE) 853/2004 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 L139 de 30.4.2004, p. 1-151.
- Reglamento (CE) 2073/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L338 de 22.12.2005, p. 1-26
- Renter, D.G., Morris, J.G., Sargeant, J.M., Hungerford, L.L., Berezowski, J., Ngo, T., Williams, K., Acheson, D.W.K., 2005. Prevalence, risk factors, O serogroups, and virulence profiles of Shiga toxin-producing bacteria from cattle production environments. J. Food Prot. 68, 1556–65.
- Roopnarine, R.R., Ammons, D., Rampersad, J., Adesiyun, A.A., 2007. Occurrence and characterization of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) strains from dairy farms in Trinidad. Zoonoses Public Health 54, 78–85. doi:10.1111/j.1863-2378.2007.01024.x
- Saridakis, H.O., el Gared, S.A., Vidotto, M.C., Guth, B.E., 1997. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. Vet. Microbiol. 54, 145–1453. doi:10.1016/S0378-1135(96)01278-3
- 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. Emerg. Infect. Dis. 17, 7–15. doi:10.3201/eid1701.091101p1
- Singh, P., Sha, Q., Lacher, D.W., Del Valle, J., Mosci, R.E., Moore, J.A., Scribner, K.T., Manning, S.D., 2015. Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. Front. Cell. Infect. Microbiol. 5, 1–13. doi:10.3389/fcimb.2015.00029
- 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 cheeses collected at producer level. J. Dairy Sci. 91, 2561–2565. doi:10.3168/jds.2008-1055

- Trabulsi, L.R., Keller, R., Gomes, T.A.T., 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 508–513. doi:10.3201/eid0805.010385
- Trevisani, M., Mancusi, R., Delle Donne, G., Bacci, C., Bassi, L., Bonardi, S., 2014. Detection of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine dairy herds in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 184, 45–49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.033
- Trevisani, M., Mancusi, R., Riu, R., Serraino, A., 2013. Quantitative detection of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* O157 and O26 in bulk raw milk. *Food Anal. Methods* 6, 1750–1758. doi:10.1007/s12161-013-9691-8
- Trmčić, A., Chauhan, K., Kent, D.J., Ralyea, R.D., Martin, N.H., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2016. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *J. Dairy Sci.* 99, 6105–6120. doi:10.3168/jds.2016-11112
- Van Kessel, J.A.S., Karns, J.S., Lombard, J.E., Koprak, C. a, 2011. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies. *J. Food Prot.* 74, 759–768. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-423
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y., 2017. Comparison by multilocus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from food samples and human and animal faecal specimens. *J. Appl. Microbiol.* 122, 268–278. doi:10.1111/jam.13322
- 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 cheese within a 3-year monitoring program. *J. Food Prot.* 73, 88–91.



## Capítulo II

Caracterización y relaciones genéticas de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) aisladas de leche de vaca y del ambiente de las explotaciones.



## 1. INTRODUCCIÓN

El grupo de STEC está formado por bacterias zoonóticas que pueden ser transmitidas por los alimentos y el agua, comprendiendo cepas con un alto potencial patógeno para la población (Fruth et al., 2015). El tracto gastrointestinal de los rumiantes es el principal reservorio de STEC por lo que a menudo están involucrados en brotes asociados al consumo de leche y productos lácteos contaminados (Gould et al., 2013). Entre los años 2009 y 2014 en EE.UU. se registraron 14 brotes de STEC relacionados con el consumo de leche y derivados lácteos (Costard et al., 2017), mientras que en el periodo de 2010 a 2013 se detectaron cinco brotes de STEC en la UE por el consumo de diferentes productos lácteos (van Asselt et al., 2017).

Los microorganismos comprendidos en el grupo patógeno STEC son responsables de causar enfermedad gastrointestinal grave (CH), insuficiencia renal aguda (SUH), secuelas crónicas (por ejemplo, síndrome del intestino irritable y enfermedad renal en etapa terminal) o muerte (Spinale et al., 2013). Se ha estimado que este grupo es responsable de aproximadamente 2.801.000 enfermedades agudas anualmente en todo el mundo, con 3.890 casos de SUH y 230 muertes (Majowicz et al., 2014).

Una de las características que define el grupo STEC es la presencia de los genes que codifican para las toxinas Shiga, que son un factor importante de virulencia en la patogénesis de la enfermedad causada por este grupo (Amagliani et al., 2018). Estas toxinas son divididas en dos grupos, Stx1 y Stx2, y cada grupo se puede asociar a distintos subtipos genéticos. Así, se identifican las variantes genéticas *stx1a*, *stx1c* y *stx1d* para Stx1, mientras que son siete las correspondientes a la toxina Stx2 (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* y *stx2g*) (Scheutz et al., 2012). Pacientes con desarrollo de SUH se han visto estrechamente asociados con infecciones por cepas portadoras del gen *stx2* (Friedrich et al., 2002), principalmente los subtipos *stx2a*, *stx2c* y *stx2d* (Bielaszewska et al., 2006; Persson et al., 2007). STEC también pueden albergar otros genes de virulencia como el *ehlyA*, codificante para la enterohemoilisina (Schmidt et al., 1995), y el *saa* de la adhesina autoaglutinante

(Paton y Paton, 2002). Además, en el grupo de STEC se incluyen los miembros del patotipo de *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), caracterizados por tener una isla de patogenicidad denominada LEE que incluye el gene *eae* codificante de la intimina, proteína responsable de la adhesión al epitelio del intestino (Kaper et al., 2004).

Aunque el serotipo O157:H7 sigue siendo el principal responsable de las enfermedades causadas por STEC, se ha incrementado el número de brotes asociados con cepas no-O157 LEE-negativas en EE.UU. y Europa (Brooks et al., 2005; Buvens et al., 2012; Gould et al., 2013; Preußel et al., 2013). Se han identificado más de 200 serotipos de STEC no-O157, de los cuales, más de 100 pueden causar enfermedad en humanos (Fratamico et al., 2004; Thapaliya et al., 2015). Seis serogrupos de STEC, que incluyen O26, O45, O103, O111, O121 y O145, se reconocen como la causa del 70% de las infecciones por STEC no-O157 y son conocidos como “*big six*” STEC no-O157 (Wang et al., 2013).

Los rumiantes, como principal reservorio de STEC, eliminan en sus heces estos patógenos contaminando el ambiente de las explotaciones y contribuyendo a su fácil difusión por su elevada capacidad de supervivencia (Fremaux et al., 2008). De esta forma se podría justificar la presencia de cepas STEC en la leche directamente a partir de las heces, aunque parece necesario aportar información sobre la posible diseminación de STEC en la explotación por otras vías, cómo se produce esta diseminación a través del propio ambiente y/o los animales hasta contaminar la leche, así como la posible relación entre las cepas presentes en los diferentes orígenes. Este tipo de información no es abundante en la bibliografía científica, hasta tal punto que se ha puesto de manifiesto la necesidad de evaluar cuantitativamente el riesgo por STEC en leche cruda y sus productos derivados con el objetivo de reducir la incertidumbre típica derivada de la escasez de datos (Farrokh et al., 2013).

Por otro lado, la resistencia bacteriana a los compuestos antimicrobianos es un problema mundial de salud pública. La ineficiencia de los tratamientos clínicos antimicrobianos por resistencias bacterianas han aumentado las tasas de morbilidad y mortalidad (da Costa et al., 2013). La exposición a bacterias

resistentes a través de la cadena alimentaria ha ganado una mayor atención en los últimos años ya que la presencia en alimentos y agua de bacterias resistentes se estima muy relacionada al desarrollo y la diseminación de antibiorresistencias en patógenos bacterianos humanos (Rao et al., 2011). La presencia de cepas STEC MDR a compuestos antimicrobianos constituyen un riesgo importante para la salud pública ya que son un reservorio de genes de resistencia, con posibilidad de ser transferidos a otras enterobacterias patógenas y, finalmente, al tracto gastrointestinal humano, que podría actuar como reservorio de genes de resistencia a antibióticos (Ahmed y Shimamoto, 2015; Rolain, 2013). En los últimos años, algunos trabajos ya han puesto de manifiesto la presencia de cepas STEC MDR en leche (Ahmed y Shimamoto, 2015; Mohammadi et al., 2013; Solomakos et al., 2009).

Este capítulo se llevó a cabo para dar respuesta a los siguientes objetivos: (a) caracterizar las cepas de STEC aisladas de leche de vaca y del ambiente de explotaciones de vacuno lechero, (b) establecer las posibles fuentes de contaminación a través de la determinación de las relaciones genéticas de las cepas de leche de vaca y del entorno ganadero mediante técnicas de tipificación molecular (PFGE y MLST), y (c) determinar la importancia de la población de STEC estudiada como portadora de resistencias a compuestos antimicrobianos.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS STEC DE ORIGEN VACUNO

Se caracterizaron los aislados presuntos STEC recogidos de los trabajos llevados a cabo en el Capítulo I. En total se estudiaron 16 cepas de STEC: siete se aislaron a partir de otras tantas muestras de leche de tanque y nueve fueron obtenidas de los muestreos ambientales en las explotaciones (cuatro de manipuladores, dos de heces, dos del aire, y una del pienso). Las pruebas de caracterización fueron realizadas a partir de la recuperación de las cepas almacenadas a -30°C en TSB-YE (37 °C / 24 h), y posterior siembra en agar SMAC (37 °C / 24 h).

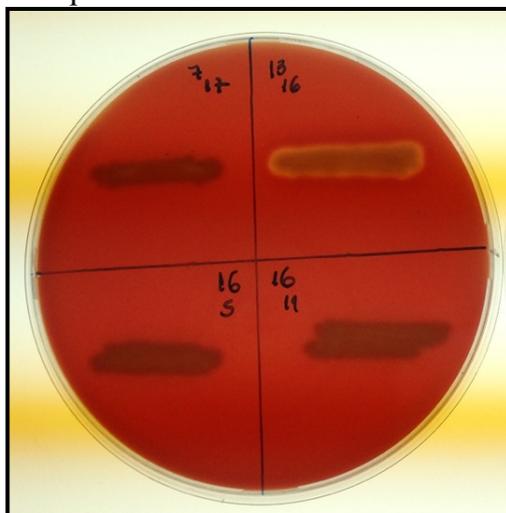
### 2.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Para la caracterización bioquímica de las cepas de STEC se utilizaron los siguientes medios (Harrigan, 1998):

- *Triple Sugar Iron Agar* (TSI, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido): para determinar la fermentación de carbohidratos (lactosa, sacarosa y dextrosa), la producción de gas y de ácido sulfhídrico.
- *Lysine Iron Agar* (LIA, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido): para verificar la capacidad de las cepas en descarboxilar o desaminar la lisina, y la producción de ácido sulfhídrico.
- *Sulfide Indole Motility* (SIM, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido): para observar la producción de indol, la movilidad y la capacidad de formación de ácido sulfhídrico.
- *Motility Indole Ornithine* (MIO, Difco, Detroit, Michigan, EE.UU.): principalmente para observar la capacidad de las cepas en descarboxilar la ornitina.
- Citrato Simmons (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido): para verificar la capacidad de las cepas en utilizar el citrato como fuente de energía (nitrógeno y carbono).

- SMAC: para distinguir las cepas capaces de utilizar el sorbitol (colonias rosas) de las que no presentan esta capacidad (colonias incoloras).
- *Methyl Red Voges Proskauer* (MR-VP, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido): las cepas de *E. coli* positivas en la prueba del MR producen un alto nivel de ácido durante la fermentación de la dextrosa que se revela con un color rojo. Mientras, en la prueba de VP la reacción típica es negativa al carecer de la capacidad de producir acetoina como producto final de la fermentación de la dextrosa.
- Agar urea (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido): para verificar la capacidad de utilizar la urea.
- Enterohaemolysina agar: fue llevado a cabo según Beutin et al. (1989). En síntesis, las cepas fueron inoculadas en Enterohaemolysina agar e incubadas a 37 °C durante 24 horas, comprobando la hemólisis tras 4 horas de incubación y, si ésta estaba presente, calificada como  $\alpha$ -hemolisina. Cuando la hemólisis aparecía solo después de 24 horas de incubación se consideró como productora de enterohemolisina (Figura II.1).
- CHROMagar™ O157 (Becton Dickinson, Paris, Francia): medio cromogénico para diferenciar las colonias O157, con color malva, de las no O157, de color azul o incoloras.

**Figura II.1.** Prueba de detección de enterohemolisina en el medio Enterohaemolysina agar. La siembra superior derecha representa una cepa enterohemolítica mientras que en los demás cuadrantes no se muestra hemólisis.



### 2.3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

Las cepas de STEC fueron investigadas mediante la técnica de PCR para la presencia de los siguientes genes:

- Los genes que codifican para las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*) y sus subtipos.
- Los genes que codifican para el antígeno somático O157 (O157 *rfbE*) y flagelar H7 (*fliCh7*).
- El gen que codifica para la intimina (*eae*).
- El gen que codifica para la enterohemolisina (*ehlyA*).
- El gen que codifica para la citotoxina subtilasa (*subAB*).
- El gen que codifica la adhesina autoaglutinante (*saa*).
- El gen que codifica para el determinante genético de invasión A (*tia*).

Las condiciones para cada gen investigado de las reacciones de PCR llevadas a cabo se muestran en la Tabla II.1 y los correspondientes cebadores utilizados se relacionan en la Tabla II.2. Los productos de la PCR fueron revelados mediante electroforesis en un gel de agarosa y observación en un transiluminador según se describe en el apartado 2.3 del Capítulo I.

### 2.4. PRUEBAS SEROLÓGICAS

Para la detección previa de los serogrupos O26, O91, O103, O111, O128 y O145 en las cepas investigadas se utilizó la prueba Dryspot *E. coli* Seroscreen (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Este *kit* comercial utiliza partículas de látex azul sensibilizadas con anticuerpos específicos contra los antígenos somáticos correspondientes a los serogrupos investigados, y desecadas sobre la superficie de tarjetas que en presencia de los antígenos específicos forman grumos visibles.

Para llevar a cabo la prueba, se utilizaron colonias de cada cepa obtenidas en placas de agar SMAC, incubadas a 37 °C durante 24 horas, continuando con el procedimiento recomendado por el fabricante que, en síntesis, se indica a continuación:

Capítulo II. Caracterización y relaciones genéticas de cepas STEC de origen vacuno

**Tabla II.1.** Cebadores utilizados para la caracterización genética de las cepas STEC.

Diana	Cebador	Producto	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb) <sup>1</sup>	Referencia
<i>stx1</i>	stx1F	toxina Shiga 1	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	(Pollard et al., 1990)
	stx1R		AGCGATGCAGCTATTAATAA		
<i>stx2</i>	stx2F	toxina Shiga 2	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	478	(Olsen et al., 1995)
	stx2R		GGATGCATCTCTGGTCATTG		
<i>eae</i>	eaeF	intimina	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	(Paton y Paton, 1998)
	eaeR		CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>O157rfbE</i>	O157-AF	antígeno O157	CTACAGGTGAAGGTGGAATGG	327	
	O157-AR		ATTCTCTCTTTCCTCTGCGG		
<i>fliCh7</i>	flic-a	antígeno H7	TACCATCGCAAAAGCAACTCC	247	(Wang et al., 2002)
	flic-b		GTCGGCAACGTTAGTGATACC		
<i>ehlyA</i>	HlyA-a	enterohemolisina	AGCTGCAAGTGCGGGTCT G	569	
	HlyA-b		TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC		
<i>subAB</i>	RTsubABF	subtilasa	GCAGATAAATACCCCTCACTTG	230	(Paton et al., 2004)
	RTsubABR		ATCACCAGTCCACTCAGCC		
<i>saa</i>	saa-DF	Adhesina autoaglutinante	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	(Paton y Paton, 2002)
	saa-DR		ATGGACATGCCTGTGGCAAC		
<i>tia</i>	tia-lo	loci toxigénico de invasión A	TCCATGCGAAGTTGTTATCA	650	(Tozzoli et al., 2010)
	tia-sense		TTCTCTTTTACCCTGCTTTTTCG		
<i>stx1a</i>	stx1aF	toxina Shiga 1 subtipo a	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478	
	stx1aR		GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG		
<i>stx1c</i>	stx1cF	toxina Shiga 1 subtipo c	CCTTTCTGGTACAACGCGGTT	252	
	stx1cR		CAAGTGTTGTACGAAATCCCTCTGA		
<i>stx1d</i>	stx1dF	toxina Shiga 1 subtipo d	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203	
	stx1dR		CTCTTCTCTGGTTCTAACCCCATGATA		
<i>stx2a</i>	stx2aF	toxina Shiga 2 subtipo a	GCGATACTG(A/G)G(C/G)ACTGTGGCC	349	
	stx2a-R2		GCCACCTTCACTGTGAATGTG		
	stx2a-R3		CCG(G/T)CAACCTTCACTGTAAATGTG		
<i>stx2b</i>	stx2bF	toxina Shiga 2 subtipo b	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	251	
	stx2bR		CAGCAAATCCTGAACCTGACG		
<i>stx2c</i>	stx2cF	toxina Shiga 2 subtipo c	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	177	(Scheutz et al., 2012)
	stx2cR		CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA		
<i>stx2d</i>	stx2d-F1	toxina Shiga 2 subtipo d	AAA(A/G)TCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	179	
	stx2d-R1		TT(C/T)CCGGCCACTTTTACTGTG		
	stx2d-R2		GCCTGATGCACAGGTACTGGAC		
<i>stx2e</i>	stx2e-F1	toxina Shiga 2 subtipo e	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	411	
	stx2e-R2		CTTCTGACACCTTACAGTAAAGGT		
<i>stx2f</i>	stx2f-F1	toxina Shiga 2 subtipo f	TGGGCGTCATTCCTGGTTG	424	
	stx2f-R1		TAATGGCCCGCCTGTCTCC		
<i>stx2g</i>	stx2g-F1	toxina Shiga 2 subtipo g	CACCGGTTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573	
	stx2g-R1		GATGGCAATTCAGAATAACCGCT		

<sup>1</sup>pb: Pares de bases

**Tabla II.2.** Condiciones utilizadas para la detección de los genes característicos en STEC mediante PCR.

<i>stx1 y stx2</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	25 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	56°C	72°C	72°C
Tiempo	5 minutos	30 segundos	40 segundos	1 minuto	1,5 minutos
<i>eae</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	94°C	92°C	59°C	72°C	72°C
Tiempo	3 minutos	30 segundos	30 segundos	1 minuto	1,5 minutos
<i>fliC7, rfbEO157 y ehlyA</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
Tiempo	8 minutos	30 segundos	30 segundos	30 segundos	7 minutos
<i>tia</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	25 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	94°C	56°C	72°C	72°C
Tiempo	5 minutos	50 segundos	60 segundos	40 segundos	7 minutos
<i>subAB</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	25 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	94°C	55°C	72°C	72°C
Tiempo	2 minutos	30 segundos	1 minuto	1 minuto	5 minutos
<i>stx1(a, c y d) y stx2 (a, b, c, d, e, f y g)</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	25 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	94°C	62°C	72°C	72°C
Tiempo	5 minutos	30 segundos	30 segundos	1 minuto	7 minutos

- Se añadió una gota (50 µl) de solución salina al círculo pequeño en el área de la prueba, con precaución para que el líquido no se mezclara con el reactivo de látex desecado.
- Se tomó una colonia de la placa de agar SMAC con un asa estéril (suministrada con el *kit*) y se mezcló con PBS hasta obtener una solución ligeramente turbia y uniforme.
- Se extendió con la espátula la suspensión hacia el área de reacción, donde se mezcló con el látex hasta su completa disolución.
- Después de 60 segundos imprimiendo movimientos circulares en la tarjeta, se observó la aparición o no de aglutinación.

Además, se realizó la determinación de los antígenos O y H en el Laboratorio Nacional de Referencia para la detección de *E. coli* en alimentos (LREC) utilizando el método descrito por Guinée et al. (1981). Para la determinación del antígeno O se emplearon un total de 176 antisueros O, capaces de reaccionar con los antígenos del O1 a O185 de *E. coli*, utilizando la técnica de microaglutinación. Para la determinación del antígeno H se llevó a cabo la técnica de aglutinación en tubo, empleando un total de 53 antisueros (H1 a H56). Las cepas inmóviles y no tipables para el antígeno O fueron nombradas como HNM y ONT, respectivamente.

## 2.5.DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Se determinó la resistencia a los antibióticos de cada aislado de STEC mediante el método de difusión en agar de acuerdo a las normas del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2015), probando inicialmente un conjunto de 13 antibióticos y, de acuerdo a los resultados obtenidos, nueve más en el antibiograma ampliado (Tabla II.3).

**Tabla II.3.** Discos de compuestos antimicrobianos utilizados para las pruebas de resistencia y sus correspondientes concentraciones.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Concentración</b>
<b>Antibiograma inicial</b>	
Ampicilina (AMP)	25 µg
Estreptomicina (S)	10 µg
Cefalotina (KF)	30 µg
Ácido Nalidíxico (NA)	30 µg
Cefotaxima (CTX)	5 µg
Tetraciclina (TE)	30 µg
Amoxicilina – Ácido Clavulánico (AMC)	30 µg
Trimetropin – Sulfametoxazol (SXT)	25 µg
Gentamicina (CN)	10 µg
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg
Kanamicina (K)	30 µg
Cloranfenicol (C)	30 µg
“Compound sulphonamides” (SSS)	300 µg
<b>Antibiograma ampliado</b>	
Cefoxitina (FOX)	30 µg
Cefepima (FEP)	30 µg
Cefaclor (CEC)	30 µg
Ticarcilina (TIC)	75 µg
Ceftazidima (CAZ)	30 µg
Aztreonam (ATM)	30 µg
Piperaciclina (PRL)	30 µg
Cefuroxima (CXM)	30 µg
Imipenem (IPM)	10 µg

El antibiograma fue realizado en placas de agar *Mueller Hinton* (MH; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a partir de la recuperación de las cepas en cultivos puros sembrados en placas de TSA-YE, según se describe a continuación:

- **Inóculo:** colonias de cultivos puros de cada cepa fueron diluidas en solución salina hasta alcanzar la turbidez 0,5 de la escala de McFarland.
- **Inoculación:** antes que transcurriesen 15 minutos desde la preparación del inóculo, se utilizó un hisopo estéril que fue sumergido en la suspensión, eliminando el exceso presionando el hisopo contra la pared del tubo. Posteriormente, se sembró por extensión total sobre la placa de cultivo.

- Aplicación de los discos antibióticos: los discos fueron colocados sobre las placas de cultivo antes de que transcurriesen 15 minutos desde la inoculación, con la precaución de que éstos estuvieran en contacto con el agar. Se colocaron como máximo cinco discos por placa para evitar que los halos de inhibición se superpusiesen.
- Incubación: las placas fueron incubadas durante 18 horas a 37 °C en los 15 minutos siguientes a la aplicación de los discos.
- Medición e interpretación de susceptibilidad: tras la incubación, los halos fueron medidos con un calibre digital y los diámetros fueron comparados con los presentados en la Tabla II.4. Las cepas STEC estudiadas se clasificaron en sensibles (S), intermedias (I) y resistentes (R).

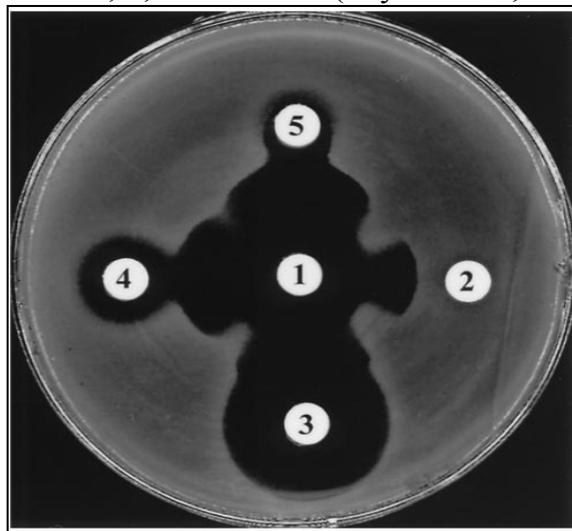
**Tabla II.4.** Relación de compuestos antimicrobianos y diámetros de las zonas de inhibición para clasificar las cepas STEC como resistentes (R), intermedias (I) o sensibles (S) a los compuestos antimicrobianos estudiados.

Compuesto antimicrobiano	Diámetro de inhibición (mm)			Referencia
	S	I	R	
Ampicilina (AMP)	≥14	-	<14	(EUCAST, 2017)
Amoxicilina – Ácido Clavulánico (AMC)	≥19	-	<19	
Cefotaxima (CTX)	≥20	-	<17	
Gentamicina (CN)	≥17	-	<14	
Ciprofloxacina (CIP)	≥26	-	<24	
Trimetropin – Sulfametoxazol (SXT)	≥14	-	<11	
Clorofenicol (C)	≥18	-	<12	
Cefoxitina (FOX)	≥19	-	<19	
Cefepima (FEP)	≥27	-	<21	
Ticarcilina (TIC)	≥23	-	<23	
Ceftazidima (CAZ)	≥22	-	<19	
Aztreonam (ATM)	≥26	-	<21	
Piperaciclina (PRL)	≥20	-	<17	
Cefuroxima (CXM)	≥19	-	<19	
Imipenem (IPM)	≥22	-	<16	
Cefaclor (CEC)	≥18	15-17	≤14	(CLSI, 2016)
Cefalotina (KF)	≥18	15-17	≤14	
Estreptomicina (S)	≥15	12-14	≤11	
Kanamicina (K)	≥18	14-17	≤13	
Tetraciclina (TE)	≥15	12-14	≤11	
Ácido Nalidíxico (NA)	≥19	14-18	≤13	
“Compound sulphonamides” (SSS)	≥17	13-16	≤12	

### 2.5.1. Ensayo para la detección de cepas STEC productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

En primer lugar, las cepas fueron probadas frente a cefalosporinas de tercera generación [cefepodoxima (10  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), cefotaxima (30  $\mu$ g), ceftriaxona (30  $\mu$ g)] y monobactámicos [aztreonam (30  $\mu$ g)], mediante una prueba de difusión en disco (CLSI, 2016). A los aislados que presentaron resistencia a uno de estos antibióticos se les realizó la confirmación con prueba de sinergia con doble disco (EUCAST, 2013). Este método consiste en la disposición de un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10  $\mu$ g) en el centro de una placa de MH a una distancia de 20 mm de los otros discos de antibióticos, e incubación a 37 °C durante 18 horas. La ampliación de alguno de los halos de inhibición hacia el disco con amoxicilina/ácido clavulánico, según se muestra en la Figura II.2, confirma la producción de BLEE.

**Figura II.2.** Prueba de sinergia con doble disco para la confirmación de producción de BLEE. Discos: 1, amoxicilina/ácido clavulánico; 2, cefotaxima; 3, moxalactama; 4, aztreonam; 5, ceftazidima (Poyart et al., 1998).



Además, se realizó la PCR para detectar los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, (Monstein et al., 2007) y *bla*<sub>CTX-M</sub> (Pagani et al., 2003), implicados frecuentemente en la resistencia por producción de BLEE, con los cebadores y condiciones presentadas en las Tabla II.5 y II.6. Los productos de la PCR fueron revelados mediante electroforesis en un gel de agarosa y observación en un transiluminador según se describe en el apartado 2.3 del Capítulo I.

**Tabla II.5.** Cebadores utilizados para la determinación de los genes responsables de la producción de BLEE.

Diana	Cebador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb) <sup>1</sup>	Referencia
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-164.SE	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	445	(Monstein et al., 2007)
	TEM-165.AS	ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT		
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	bla-SHV.SE	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	747	
	bla-SHV.AS	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA		
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	ctxM-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593	(Pagani et al., 2003)
	ctxM-R	TGGGTRAARTARGTSACCAGA		

<sup>1</sup>pb: Pares de bases

**Tabla II.6.** Condiciones utilizadas para la detección mediante PCR de genes asociados a la producción de BLEE.

<i>bla</i> <sub>TEM</sub>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	50°C	72°C	72°C
Tiempo	15 minutos	30 segundos	30 segundos	2 minuto	10 minutos
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	56°C	72°C	72°C
Tiempo	15 minutos	30 segundos	30 segundos	2 minuto	10 minutos
<i>bla</i> <sub>CTX_M</sub>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	50°C	72°C	72°C
Tiempo	15 minutos	30 segundos	30 segundos	2 minuto	10 minutos

## 2.6.DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE *E. COLI*

Las cepas fueron estudiadas para adscribirse a alguno de los cuatro grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2 y D) en base a la detección de alguno de los tres genes característicos según las combinaciones presentadas en la Tabla II.7.

**Tabla II.7.** Combinaciones de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN *TspE4C2* que determinan los grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) de *E. coli*.

<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4C2</i>	Grupo filogenético
-	-	-	A
-	+	-	A
-	-	+	B1
+	+	-	B2
+	+	+	B2
+	-	-	D
+	-	+	D

Para la detección de los genes se realizó una PCR triple de acuerdo a la metodología descrita por Clermont et al. (2000). Se detectaron los genes *chuA*, que es un gen necesario para el transporte del grupo hemo en *E. coli* O157:H7, *yjaA*, gen de función aún desconocida que se ha encontrado en el genoma de *E. coli* K-12, y un fragmento de ADN denominado inicialmente como *TspE4C2*. Los cebadores utilizados se recogen en la Tabla II.8 y las condiciones de realización de la PCR en la Tabla II.9.

**Tabla II.8.** Cebadores utilizados para la determinación del grupo filogenético de *E. coli*.

Diana	Cebador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb) <sup>1</sup>	Referencia
<i>ChuA</i>	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	(Clermont et al., 2000)
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>yjaA</i>	YjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

<sup>1</sup>pb: Pares de bases

**Tabla II.9.** Condiciones utilizadas para la detección de los determinantes característicos de los grupos filogenéticos de *E. coli* mediante PCR.

<i>chuA, yjaA y TspE4C</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C
Tiempo	5 minutos	30 segundos	30 segundos	30 segundos	7 minutos

Los productos de la PCR fueron revelados mediante electroforesis en un gel de agarosa y observación en un transiluminador según se describe en el apartado 2.3 del Capítulo I.

## 2.7. TIPIFICACIÓN MEDIANTE *PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS* (PFGE)

Para llevar a cabo la técnica de PFGE, las 16 cepas de STEC fueron sembradas en placas de TSA-YE e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Se siguió la metodología descrita en la red PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org>) para STEC no-O157 (Pulsenet International, 2013) y en breve consistió en las siguientes etapas:

- Suspensión celular: fueron resuspendidas colonias aisladas de las placas de TSA-YE en 1 ml de *Cell Suspension Buffer* (CSB, 100 mM Tris - 100 mM EDTA). Se continuó con la homogeneización y lectura de la absorbancia (OD<sub>620</sub>). Los resultados de la absorbancia se utilizaron para calcular el volumen necesario de CSB para dilución de la suspensión, obteniendo así la solución de trabajo. La ecuación utilizada para calcular la solución de trabajo fue la siguiente:  $Vol_{dil} = (OD_{620} \times 40 \times 210) - 210$ .
- "Plugs" de agarosa: se homogeneizaron 400 µl de la solución de trabajo, 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 400 µl de *Seaken Gold Agarose* (Lonza, Rockland, ME, EE.UU.) al 1% en TE *buffer* (10 Mm Tris: 1 mM EDTA PH 8). La solución se distribuyó en moldes desechables.
- Lisis celular: los "plugs" de agarosa solidificados se colocaron en tubos con 5 ml de *Cell Lysis Buffer* (CLB, 50 mM Tris - 50 mM EDTA - 1% Sarcosyl)

con 25 µl de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml obteniendo una concentración final de 0,1 mg/ml. Después de la adición de CLB, los tubos fueron incubados a 55 °C con agitación (150-175 rpm) durante dos horas.

- Lavado de los "plugs": se realizaron dos lavados con 10 ml de agua estéril y tres lavados con 10 ml de TE *buffer*, los lavados se realizaron a 50 °C en agitación (150-175 rpm).
- Restricción enzimática del ADN: después de los lavados, los "plugs" fueron transferidos a tubos con 200 µl de la solución tampón de la enzima de restricción (1X) e incubados durante 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, se inició la digestión del ADN con 200 µl de la solución de restricción – 50U de la enzima *Xba*I, *buffer* de restricción (1X) y albúmina de suero bovino (1X) - con incubación a 37 °C durante tres horas.
- Electroforesis: después de la digestión enzimática, los "plugs" fueron colocados en gel de agarosa 1% en TBE 0,5X (Tris-Borate EDTA *Buffer*). La electroforesis fue realizada en el equipo Cheff DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.), con tampón TBE 0,5X a 14 °C, y las condiciones fueron las siguientes:
  - Pulso inicial: 6,76 s
  - Pulso final: 35,38 s
  - Voltaje: 6 V
  - Ángulo de inclinación: 120°
  - Tiempo: 19 horas
- Tinción del gel: al finalizar la electroforesis, se prosiguió con la tinción del gel en solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) durante aproximadamente 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos se realizó la decoloración del gel en agua destilada, donde permaneció durante una hora más. Los resultados se observaron en luz ultravioleta en un transiluminador y las imágenes fueron tomadas con un equipo fotográfico específico de captura de geles.
- Análisis de las imágenes: el tratamiento y análisis de las imágenes se realizó con el software GelCompar II (Applied Maths, Keijkstraat, Sint-Martens-

Latem, Bélgica). Se utilizó el coeficiente de similitud de Dice, con 0,5% de optimización y 1,5% de tolerancia, y la representación gráfica mediante dendrograma se llevó a cabo utilizando el método de agrupamiento UPGMA.

## 2.8. TIFICACIÓN MEDIANTE *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING* (MLST)

Para establecer las relaciones filogenéticas de las cepas de STEC se utilizó la técnica de MLST mediante la amplificación, purificación y secuenciación de siete genes *housekeeping* (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA* - Tabla II.10).

**Tabla II.10.** Cebadores utilizados para la amplificación de los siete genes *housekeeping* en las cepas STEC mediante la técnica MLST.

Diana	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb) <sup>1</sup>	Referencia
<i>adk</i>	adkF	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	(Wirth et al., 2006)
	adkR	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>fumC</i>	fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	
	fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>gyrB</i>	gyrBF	TCGGCGACACGGATGACGGC	911	
	gyrBR	ATCAGGCCTTACGCGCATC		
<i>icd</i>	icdF	ATGGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878	
	icdR	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdh</i>	mdhF1	AGCGGTTCTGTCAAATGC	932	
	mdhR1	CAGGTTTCAGAACTCTCTCTGT		
<i>purA</i>	purAF	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	
	purAR	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>recA</i>	recAF	CGCATTGCTTTACCCTGACC	780	
	recAR	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA		

<sup>1</sup>pb: Pares de bases

Las condiciones de desarrollo de la PCR se muestran en la Tabla II.11 y fueron adoptadas del portal específico para MLST de la Universidad de Warwick, que actualmente es accesible a través del enlace web <http://enterobase.warwick.ac.uk>.

Una vez realizada la PCR, los productos obtenidos fueron purificados con el kit *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and GEL Band Purification* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La secuenciación de los productos de PCR fue realizada en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León utilizando el secuenciador Megabace 500 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA).

**Tabla II.11.** Condiciones de la técnica de PCR utilizada para la detección de los genes *housekeeping* en las cepas de STEC mediante MLST.

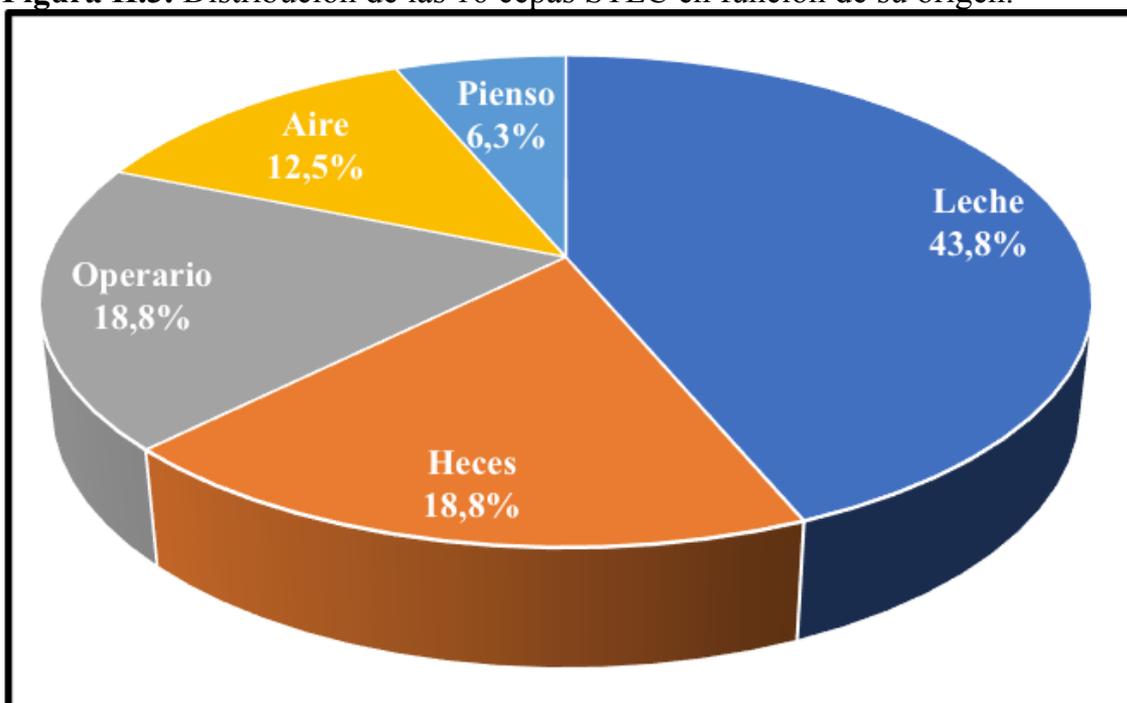
<i>adk, fumC, icd y purA</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	54°C	72°C	72°C
Tiempo	2 minutos	1 minuto	1 minuto	2 minutos	5 minutos
<i>recA</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
Tiempo	2 minutos	1 minuto	1 minuto	2 minutos	5 minutos
<i>gyrB y mdh</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
Tiempo	2 minutos	1 minuto	1 minuto	2 minutos	5 minutos

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y editadas mediante el uso del software Chromas Pro 2.1.5 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). A cada *locus* de los diferentes genes estudiados se le asignó un número de alelo y con la combinación de los distintos alelos fue posible obtener la ST para cada cepa. Tanto los alelos como los ST fueron obtenidos comparando las secuencias de cada gen *housekeeping* con las que aparecen en la base de datos de la web Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>). Se formaron grupos clonales en función de la presencia de variantes sencillas en uno o dos *loci* utilizando el algoritmo eBursts del programa START2 (Jolley et al., 2001). Con las secuencias concatenadas de las secuencias individuales de los genes de MLST (*adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA*) de una cepa representativa de cada ST se construyó un árbol filogenético utilizando el método Neighbor-Joining (NJ), estimando las distancias con el modelo de parámetro-2 de Kimura y un “bootstrap” de 1000 repeticiones mediante el software MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Finalmente, con el resultado obtenido se representaron las distancias relativas entre los ST mediante un análisis *split decomposition* con el software *Splitstree* para Windows (Huson y Bryant, 2006).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 16 cepas de STEC fueron caracterizadas. De acuerdo con la distribución presentada en la Figura II.3, estas cepas se obtuvieron de siete muestras de leche de vaca (43,8%) y de nueve muestras ambientales (56,2%) correspondientes a los operarios de las explotaciones, las heces de las camas de los animales, el aire y el pienso de varias explotaciones de vacuno lechero.

**Figura II.3.** Distribución de las 16 cepas STEC en función de su origen.



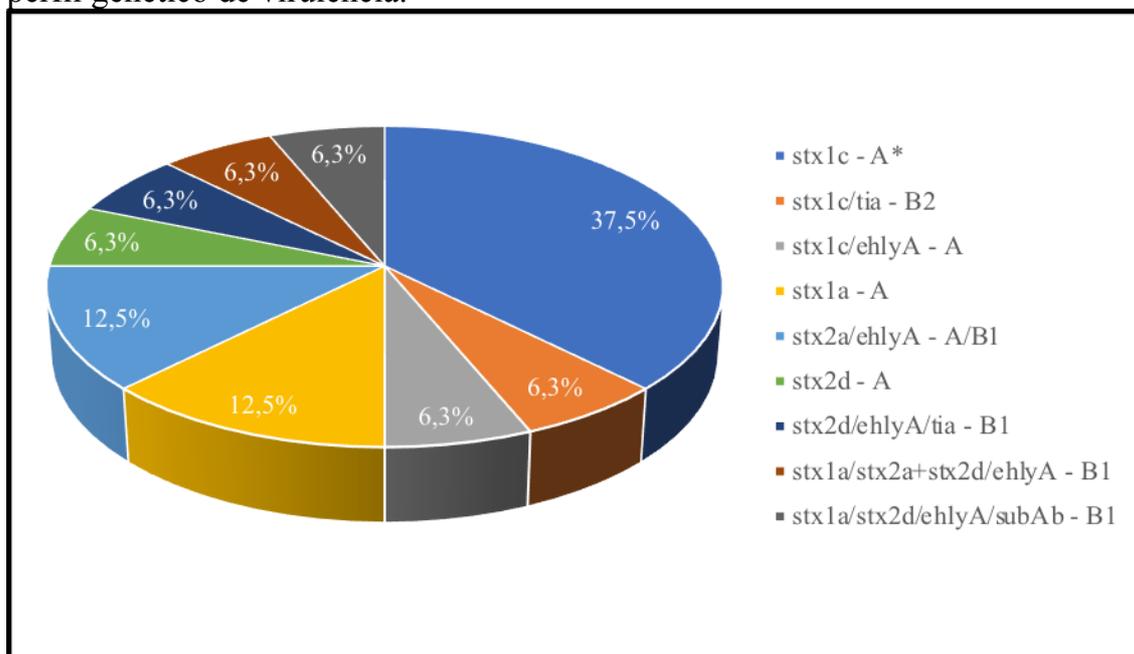
#### 3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE LAS CEPAS STEC.

Todas las cepas de STEC estudiadas fermentaron la lactosa, fueron positivas en la prueba del RM y negativas en la prueba VP, no producían H<sub>2</sub>S y no eran capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono. Al contrario que el resto de cepas STEC, la cepa denominada MK40C20 fue indol<sup>-</sup> y la denominada AR6C2 fue sorbitol<sup>-</sup>. Además, un 81,3% (13/16) de las cepas fueron capaces de descarboxilar la lisina, mientras que solo el 37,5% (6/16) descarboxilaron la ornitina. Tan solo la cepa H10C3 metabolizó la urea, capacidad atribuida a la mayoría de las cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (Nakano et al., 2004).

Al contrario de las cepas de *E. coli* O157:H7 que generalmente son sorbitol y  $\beta$ -glucuronidasa negativas, las cepas de STEC no-O157 no tienen características fenotípicas marcadas que pueden distinguirlas de otras cepas de *E. coli* no patógenas, e incluso de las cepas O157 (de Boer et al., 2015; Fratamico et al., 2004).

Los genes marcadores de virulencia detectados, los grupos filogenéticos asociados y las características de resistencia en los aislados de STEC se muestran en la Tabla II.12. En la Figura II.4 se presenta la distribución de los perfiles genéticos asociados a las cepas investigadas.

**Figura II.4.** Distribución de las 16 cepas de STEC estudiadas en función de su perfil genético de virulencia.



\*En una cepa se detectaron los subtipos *stx1c* y *stx1a*.

Once de las 16 cepas de STEC (69,8%), aisladas de leche de vaca (6/11), muestras de operarios (3/11) y heces de las camas (2/11), se agruparon filogenéticamente en el grupo A. Tres aislados de STEC pertenecían al grupo filogenético B1, presentaban los perfiles genéticos *stx2d*<sup>+</sup>/*ehlyA*<sup>+</sup>/*tia*<sup>+</sup>, *stx1a*<sup>+</sup>/*stx2d*<sup>+</sup>/*ehlyA*<sup>+</sup> y *stx1a*<sup>+</sup>/*stx2d*<sup>+</sup>/*subAB*<sup>+</sup> respectivamente, y procedían de muestras de aire y pienso. Las dos cepas restantes, de leche de vaca (*stx1c*<sup>+</sup>/*tia*<sup>+</sup>) y de heces (*stx2a*<sup>+</sup>/*ehlyA*<sup>+</sup>), se incluyeron en el grupo B2. Además de presentar

alguno de los genes de las toxinas Shiga, las cepas incluidas en los grupos filogenéticos B1 y B2 albergaron otros factores de virulencia, como los genes *tia* y/o *ehlyA*, mientras que solo dos de los seis aislados pertenecientes al grupo A portaron algunos de estos otros marcadores de virulencia.

La enterohemolisina codificada por el gen *ehlyA* es un importante factor localizado en un plásmido de virulencia (Gyles, 2007). En nuestro estudio, el 37,5% (6/16) de las cepas presentaron este gen, aunque la actividad hemolítica *in vitro* fue observada solo en las cepas AR10C2 y P10C6. Esta observación se podría justificar por la falta de funcionalidad del operón de la hemolisina, que fue evidente en el trabajo de Askari Badouei et al. (2016) donde se determinó que aproximadamente la mitad de las cepas portadoras del gen *ehlyA* mostraban hemolisis *in vitro*. Esta capacidad tiene una interesante relación sanitaria ya que las cepas de los serotipos asociados con enfermedad humana muestran mayoritariamente dicha actividad hemolítica (Gonzalez et al., 2016).

La presencia del gen *stx1* fue predominante en los aislados (12/16), y tan solo dos cepas de origen ambiental presentaron simultáneamente los genes *stx1* y *stx2*. Aunque diversos trabajos muestran el subtipo *stx1a* predominante en ganado bovino (Akiyama et al., 2017; Jajarmi et al., 2017; Martin y Beutin, 2011; Monaghan et al., 2011; Shen et al., 2015), en nuestro estudio el subtipo *stx1c* fue el mayoritario (61,5%). Este subtipo ha sido asociado a cepas de STEC aisladas de cabras y ovejas (Martin y Beutin, 2011; Otero et al., 2017), y normalmente está involucrado en enfermedades más leves o incluso asintomáticas en humanos (Orth et al., 2007).

A diferencia de las variantes genéticas del *stx1* u otras variantes del *stx2* que no causan graves infecciones en humanos, subtipos como el *stx2a*, *stx2c* o *stx2d* son asociados a colitis hemorrágica y SUH (Persad y LeJeune, 2014; Scheutz, 2014). Todos los aislados de STEC estudiados que presentaron el gen *stx2* (37,5%; 6/16) estaban ampliamente distribuidos tanto en la leche de tanque como en el ambiente de las explotaciones (muestras de operarios, aire, pienso y heces de vaca), y todos presentaron los subtipos *stx2a* o *stx2d* que comúnmente se asocian con enfermedades graves en humanos (Scheutz, 2014).

**Tabla II.12.** Genes de virulencia, grupo filogenético y perfil de resistencia a antimicrobianos de cepas de STEC no-O157 aisladas de explotaciones de vacuno lechero.

Cepa	Origen	Genes de virulencia					Grupo filogenético	Resistencia a antimicrobianos	
		<i>stx1</i> (a/c)	<i>stx2</i> (a/d)	<i>ehlyA</i>	<i>tia</i>	<i>subAB</i>		Perfil <sup>1</sup>	Genes ( <i>bla</i> <sub>SHV</sub> / <i>bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> )
MK37C13	Leche	<i>stx1c</i>	-	-	-	-	A	S/C	- <sup>2</sup>
MK37C14	Leche	<i>stx1c</i>	-	-	-	-	A	S/CN/C	-
MK37C18	Leche	<i>stx1c</i>	-	-	-	-	A	S/CN/C	-
MK40C20	Leche	<i>stx1c</i>	-	+	-	-	A	- <sup>3</sup>	-
MK116C19	Leche	<i>stx1c</i>	-	-	-	-	A	-	-
MK126C1	Leche	<i>stx1c</i>	-	-	+	-	B2	-	-
MK136C13	Leche	-	<i>stx2a</i>	+	-	-	A	-	-
H5C2	Heces	<i>stx1c</i> <i>stx1a</i>	-	-	-	-	A	KF	-
H5C12	Heces	<i>stx1a</i>	-	-	-	-	A	-	-
M2C18	Operario	-	<i>stx2d</i>	-	-	-	A	AMP/S/KF/NA/TE/ SXT/C/CN/CIP/SSS/TIC/PRL	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>+</sup>
M5C1	Operario	<i>stx1c</i>	-	-	-	-	A	-	-
M5C4	Operario	<i>stx1a</i>	-	-	-	-	A	CN/K	-
AR6C2	Aire	-	<i>stx2d</i>	+	+	-	B1	AMP/KF/AMC/CN	-
AR10C2	Aire	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i> / <i>stx2d</i>	+	-	-	B1	AMP/KF/AMC	-
Ha10C3	Heces	-	<i>stx2a</i>	+	-	-	B2	KF/AMC	-
P10C6	Pienso	<i>stx1a</i>	<i>stx2d</i>	+	-	+	B1	AMP/KF/CN	-

<sup>1</sup> perfil de resistencia antimicrobiana, abreviaturas de acuerdo a la Tabla II.3.

<sup>2</sup> -, genes de resistencia investigados no detectados.

<sup>3</sup> -, sensibles a todos los antibióticos probados (n=22).

Estos resultados están en la línea de los encontrados en otros trabajos que muestran una mayor prevalencia de los subtipos *stx2a*, *stx2c* y *stx2d* en el ganado vacuno (Akiyama et al., 2017; Jajarmi et al., 2017; Wani et al., 2007).

### 3.2.DISTRIBUCIÓN SEROLÓGICA DE CEPAS DE STEC EN EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO.

Las 16 cepas de STEC estudiadas fueron asociadas a diez serotipos diferentes, no perteneciendo ninguna al serogrupo O157 (Tabla II.13). Los serogrupos detectados no se encuentran entre los más prevalentes en la mayoría de los estudios realizados en ganado vacuno de Europa (Zweifel et al., 2005), aunque los serogrupos O2 y O91 se suelen detectar en ganado bovino.

Solo una cepa (6,0%; 1/16) pertenecía al serotipo O91:H21, que fue el de mayor significatividad clínica entre los detectados en este estudio. Esta cepa O91:H21 posee el perfil de virulencia *stx1a*<sup>+</sup>/*stx2a*<sup>+</sup>/*ehlyA*<sup>+</sup>. El serogrupo O91 se ha asociado a enfermedades humanas con desarrollo de SUH. Los serotipos clasifican a EHEC en cinco grupos (A a E) de acuerdo con su incidencia en enfermedad humana. Las cepas pertenecientes al serotipo O91:H21 se incluyen en el grupo C siendo asociadas al desarrollo de SUH aunque infrecuentemente implicadas en brotes (Karmali et al., 2003).

La cepa AR6C2, aislada de una muestra de aire, fue asociada al serotipo O55:H8 y presentó los genes *ehlyA* y *tia*, además de ser *stx2d*<sup>+</sup>. Los serogrupos O91 y O55 se han notificado en humanos y animales en la UE en el período 2013-2015, siendo el serogrupo O55 asociado a casos de SUH en 2015 y responsable de una muerte (EFSA, 2016). Las cepas AR10C2 (O91:H21) y AR6C2 (O55:H8), que presentan un potencial virulento alto al portar el gen *stx2d* así como otros factores de virulencia (Tabla II.12), se aislaron de muestras de aire y, por lo tanto, es previsible pensar que estas cepas de STEC no-O157 tienen un alto potencial de disseminación en las explotaciones vacunas y, consecuentemente, podrían llegar a contaminar fácilmente la leche.

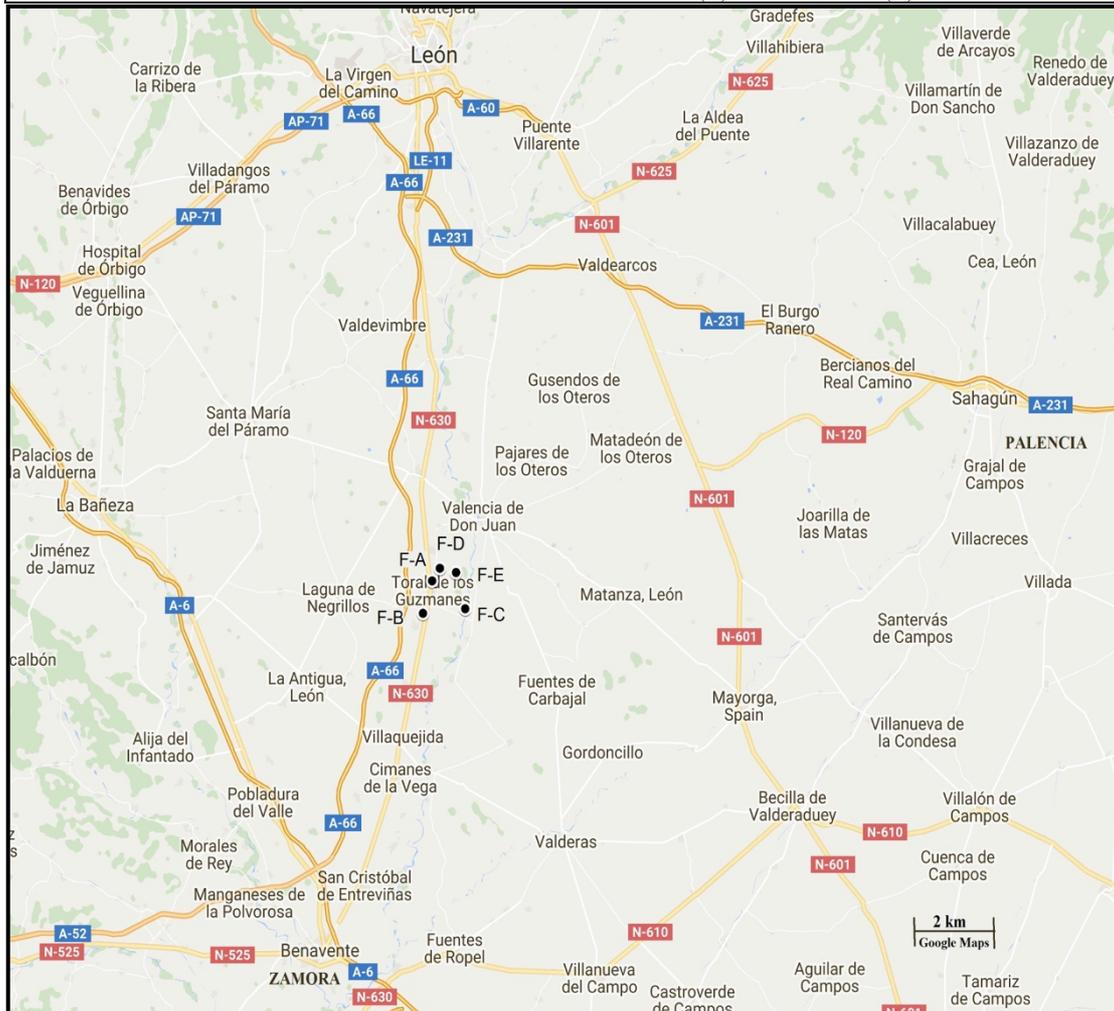
**Tabla II.13.** Distribución serológica de cepas STEC no-O157 en diferentes orígenes de explotaciones de vacuno lechero de Castilla y León.

Serotipo	Cepa	Explotación	Origen					
			Leche	Heces	Operario	Aire	Pienso	
O2:HNM	MK136C13	F-E	X					
O3:HNM	MK126C1	F-D	X					
O55:H8	AR6C2	F-C					X	
O91:H21	AR10C2	F-B					X	
O140:HNM	MK37C18	F-A	X					
	MK37C13	F-A	X					
	MK37C14	F-A	X					
	MK116C19	F-C	X					
O140:H32	H5C2	F-E		X				
	H5C12	F-E		X				
	M5C1	F-E			X			
	M5C4	F-E			X			
ONT:H1	P10C6	F-E						X
ONT:H4	M2C18	F-A			X			
ONT:H21	Ha10C3	F-B		X				
ONT:HNM	MK40C20	F-B	X					

Entre los aislados de STEC estudiados, el serotipo que presentó mayor frecuencia fue el O140:H32 (44,0%, 7/16), agrupando siete cepas aisladas de muestras de operarios, leche y heces. La cepa MK37C18 de leche de vaca también fue O140, aunque no móvil (HNM; 6,3%; 1/16). Este serogrupo O140 se distribuyó en tres explotaciones diferentes de la misma localidad (Figura II.5).

**Figura II.5.** Distribución geográfica de las explotaciones de vacuno lechero situadas en el noroeste de Castilla y León en las que fueron detectadas muestras positivas para STEC y sus serotipos asociados.

Explotación	Nº cepas	Serotipos (n)
F-A	4	O140:H32 (2)/ O140:HNM (1)/ ONT:H4 (1)
F-B	4	O91:H21 (1)/ ONT:H1 (1)/ ONT:H21 (1)/ ONT:HNM (1)
F-C	2	O140:H32 (1)/ O55:H8 (1)
F-D	1	O3:HNM (1)
F-E	5	O140:H32 (4)/ O2:HNM (1)



Los serotipos restantes, O2:HNM, O3:HNM, O55:H8, O91:H21, ONT:H1, ONT:H4, y ONT:H21, se determinaron en una única cepa, respectivamente. La cepa MK40C20 era inmóvil y no mostró ninguna reacción a los antígenos O probados. Nuestros datos revelan que cuatro de las 16 cepas (25%) no fueron tipables para el antígeno O y la misma prevalencia fue observada para las cepas inmóviles (HNM), lo que indica que la leche de vaca y el ambiente de las explotaciones pueden ser potenciales vehículos de serotipos de

STEC indeterminados (ONT:HNM). Eblen (2007) revisó datos de casos confirmados de infección por STEC no-O157 en los EE.UU. durante el período de 2000-2006, poniendo de manifiesto que cepas no tipables para el antígeno O fueron responsables del 17,4% de las infecciones. Además, la EFSA informó de un aumento en la tasa de cepas de STEC no tipables durante los últimos años (EFSA, 2016). Por lo tanto, parece importante desarrollar nuevos antisueros para la detección de serogrupos de STEC emergentes.

Durante los últimos años, una variedad representativas de trabajos han sugerido que los rumiantes son el reservorio de muchos otros serotipos de STEC además del O157:H7 (Hussein y Sakuma, 2005; Persad y LeJeune, 2014). Otros serotipos no-O157 se han relacionado con un número significativo de enfermedades humanas (Brooks et al., 2005; Buvens et al., 2012; Gould et al., 2013; Preußel et al., 2013). También debe tenerse en cuenta que la importancia para la salud pública de una amplia variedad de STEC comúnmente presentes en especies animales destinadas a la producción de alimentos sigue siendo poco clara. *E. coli* O140:H32 ha sido raramente citado en la literatura científica, limitándose a pocos estudios en vacuno (Girardeau et al., 2005; Pradel et al., 2000) y en explotaciones porcinas (Duriez y Topp, 2007), con cepas comúnmente pertenecientes al grupo filogenético A y siendo *stxI*<sup>+</sup>. Nuestros datos parecen confirmar estas mismas características ya que todos nuestros aislados O140:H32 portaban el gen *stxI* y se incluyeron en el grupo filogenético A, que normalmente se asocia a menos factores de virulencia que otros grupos (Girardeau et al., 2005). En nuestro estudio, las cepas pertenecientes a este serotipo fueron mayoritariamente *stxIc*<sup>+</sup> aunque las cepas M5C4 (procedente de un operario) y H5C12 (aislada a partir de heces de las camas) presentaron el subtipo *stxIa*, y la cepa H5C2 (muestra de heces) fue portadora de ambos subtipos (Tabla II.12).

### 3.3. RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS DE CEPAS DE STEC NO-O157 AISLADAS DE EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO.

Un número importante de las cepas STEC no-O157 estudiadas (62.5%; 10/16) mostraron resistencia a alguno de los 22 compuestos antimicrobianos probados, cuyos patrones de resistencia se muestran en la Tabla II.12.

La prevalencia de resistencia a gentamicina y a cefalotina fue del 60%, a estreptomycin, cloranfenicol y ampicilina del 40%, a amoxicilina del 30%, y a tetraciclina, ticarcilina, piperacilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, kanamicina, trimetoprim y sulfonamidas alcanzó el 10% de los aislados.

Se consideran cepas MDR aquellas que muestran resistencia a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012). En este trabajo, tres de las 10 cepas resistentes (30%) fueron MDR y eran portadoras del subtipo *stx2d* que se relaciona con una mayor importancia clínica. Entre estas cepas MDR se incluyó la cepa M2C18 portadora del gen *bla<sub>TEM</sub>* relacionado con la producción de BLEE (Monstein et al., 2007). Esta cepa serotipo ONT:H4, obtenida a partir de un operario, mostró resistencia a 12 antibióticos incluidos en ocho categorías diferentes de antimicrobianos y, aunque poseía el gen *bla<sub>TEM</sub>*, no demostró capacidad para hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, aunque sí presentaba resistencia a aztreonam que disminuía en presencia de amoxicilina-ácido clavulánico. Además, la cepa P10C6 (ONT:H1), aislada de pienso, y la AR6C2 (O55:H8), obtenida del aire, también mostraron un patrón de MDR a penicilinas (ampicilina/amoxicilina-clavulánico), cefalosporinas (cefalotina) y aminoglucósidos (gentamicina).

Las instituciones europeas están muy preocupadas por el impacto del uso de antibióticos en el aumento de bacterias resistentes a antibióticos. Un informe reciente de la UE (EFSA y ECDC, 2017) presenta nuevos datos sobre la estrecha relación entre el consumo de antibióticos y la resistencia a los mismos en humanos y en animales utilizados para la producción de alimentos en toda

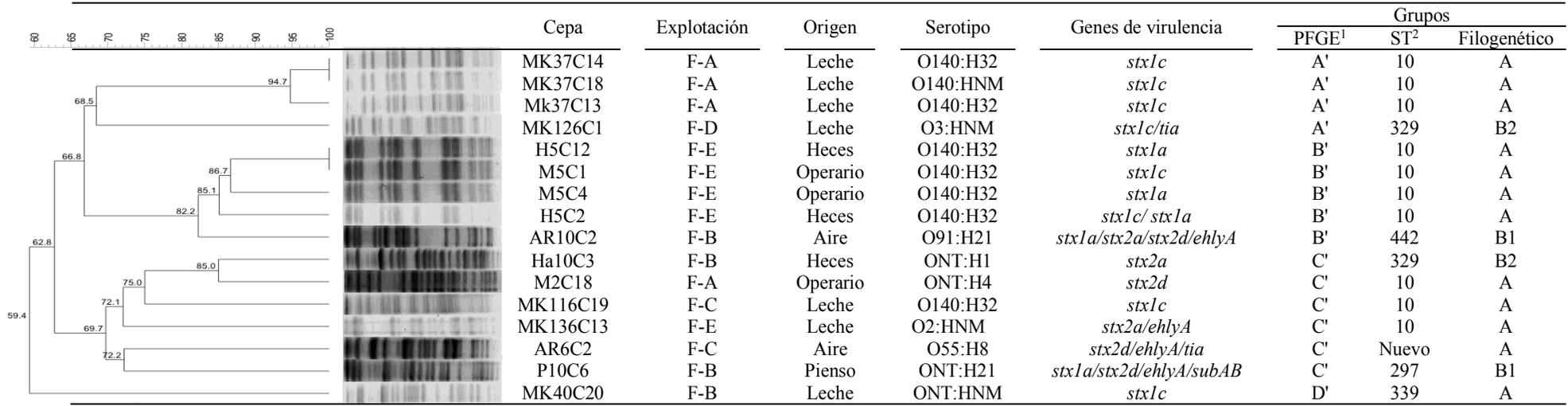
Europa. En nuestro estudio, aislamos cepas de STEC resistentes a antibióticos en leche de tanque y del ambiente de las explotaciones, algunas de las cuales presentaron un patrón de MDR. Nuestros resultados indican que el ambiente de las explotaciones puede ser un vehículo para la diseminación de cepas STEC MDR y para la contaminación de la leche de vaca. Así pues, parece adecuado recomendar buenas prácticas de manejo animal tanto en la aplicación de tratamientos terapéuticos con antimicrobianos como en la prevención de la contaminación cruzada de la leche a partir de las diferentes fuentes ambientales en las explotaciones, incluyendo las heces, los operarios, el aire y el pienso, a fin de mejorar los sistemas de control de la leche cruda y los productos lácteos derivados.

### 3.4. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS STEC NO-O157 AISLADAS DE EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO.

El análisis de ADN cromosómico bacteriano mediante PFGE con la enzima de restricción *Xba*I distinguió cuatro grupos con un coeficiente de similitud mínimo de 68,5%, designados por las letras A' a D' según se muestra en la Figura II.6. Los pulsotipos A' (cuatro cepas) y D' (una cepa) agruparon cepas aisladas de la leche de tanque, mientras que las del grupo B' (cinco cepas) procedieron exclusivamente del ambiente de las explotaciones (heces, operarios y aire). Por otro lado, el grupo C' (seis cepas) fue el más heterogéneo en cuanto al origen de las cepas ya que agrupó a STEC de leche, heces, operarios, aire y pienso.

En la Tabla II.14 se presentan los 6 perfiles de alelos o ST obtenidos a partir del análisis de las secuencias de los siete genes *housekeeping* correspondientes a las 16 cepas de STEC estudiadas.

**Figura II.6.** Dendrograma obtenido mediante PFGE (*Xba*I) de las 16 cepas de STEC no-O157 de origen vacuno y sus características asociadas.



<sup>1</sup>Grupos obtenidos mediante PFGE (letras A' a D').

<sup>2</sup>Número identificativo del perfil de alelos o secuencia tipo de acuerdo a la base de datos MLST de Achtman.

**Tabla II.14.** Secuencias tipo (STs), perfiles de alelos y frecuencias obtenidas mediante MLST de 16 cepas de STEC.

ST <sup>1</sup>	Perfil de los alelos							Frecuencia (n° de cepas)
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
10	10	11	4	8	8	8	2	10
297	6	65	32	26	9	8	2	1
329	64	4	5	83	24	8	6	2
339	6	11	82	1	7	8	2	1
442	6	95	33	18	9	8	14	1
Nuevo	6	19	3	26	11	8	173	1

<sup>1</sup>Número identificativo del perfil de alelos o secuencia tipo de acuerdo a la base de datos MLST de Achtman.

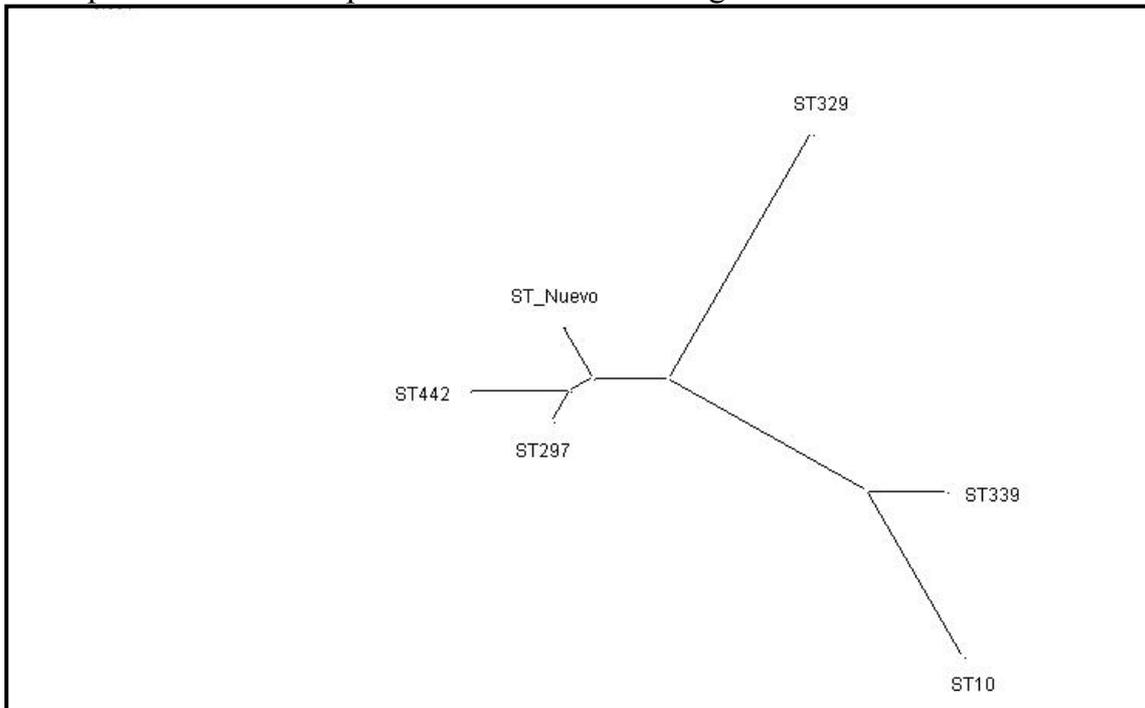
Se determinaron de 1 a 6 alelos diferentes para cada *locus*, siendo *gyrB* lo más variable (6 alelos diferentes), mientras que el gen *purA* fue el más conservado al presentar el mismo alelo en todas las cepas de STEC estudiadas. A pesar de que no se detectaron nuevos alelos, se encontró un perfil alélico en la cepa AR6C2 no registrado previamente en la base de datos MLST (Tabla II.14). Los ST 297, ST 339, ST 442, y el nuevo ST incluyeron una sola cepa cada uno, el ST 329 se asoció a un aislado de leche de tanque y otro de heces de las camas, mientras que el ST 10 fue el predominante (62,5%; 10/16), con cepas aisladas a partir de leche y de muestras ambientales (operarios y heces) procedentes de tres explotaciones diferentes ubicadas en la misma localidad (Figura II.5). Siete de las 10 cepas con este perfil alélico (ST 10) pertenecían al serotipo mayoritario O140:H32, eran *stxI*<sup>+</sup> y se asociaron al grupo filogenético A (Figura II.6). De acuerdo con la base de datos del MLST, este ST 10 agrupa muchas cepas de *E. coli* de orígenes diversos, entre las que se encuentran cepas STEC de gran importancia clínica al haber sido aisladas de pacientes con SUH y ser productoras de BLEE, presentando en algunos casos una alta similitud genética con cepas de origen alimentario (Gómez, 2017).

El análisis utilizando el algoritmo eBurst no reveló ningún complejo clonal. Las distancias relativas entre los seis ST se representan en la red filogenética *Splitstree* de la Figura II.7 y en el árbol filogenético de la Figura II.8.

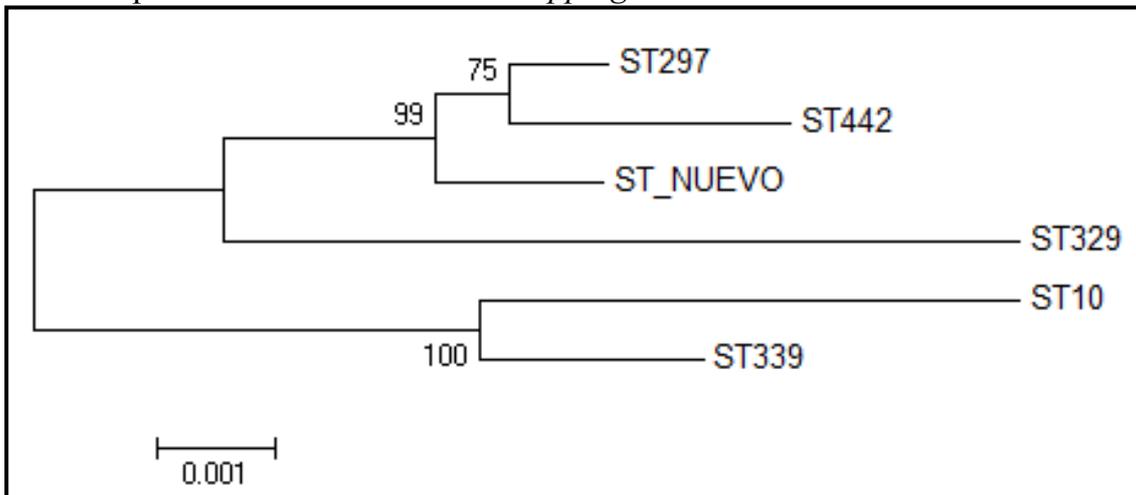
Estas representaciones gráficas de las relaciones entre los ST son concordantes e indican una gran diversidad filogenética en las cepas de STEC no-O157 de origen vacuno estudiadas en este capítulo. Esta elevada diversidad fue confirmada también mediante el análisis de PFGE, como ya ha sido puesto de manifiesto en otros trabajos con cepas de STEC de origen alimentario (Álvarez-Suárez et al., 2016; Bai et al., 2015; Nagy et al., 2015).

Tanto el análisis por PFGE como mediante MLST se mostraron independientes de los perfiles de resistencia a antibióticos, ya que se determinaron resistencias en cepas incluidas en múltiples pulsotipos o ST.

**Figura II.7.** Red filogenética obtenida con *SplitsTree* de las secuencias tipo correspondientes a 16 cepas STEC no-O157 de origen vacuno.



**Figura II.8.** Árbol filogenético de los perfiles de alelos (STs) de 16 cepas STEC no-O157 obtenidas mediante el método Neighbor-Joining. En los nodos de las ramas se presentan los valores *bootstrapping*.



#### 4. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES

En este capítulo se proporciona evidencia adicional de que la leche de vaca y el ambiente de las explotaciones ganaderas son fuentes potenciales de STEC que portan genes de virulencia y múltiples resistencias antibióticas (el 62,5% de las cepas presentó alguna resistencia), que podrían comprometer la salud pública por su potencial capacidad de infección humana y a través de la diseminación de resistencias antimicrobianas a lo largo de la cadena alimentaria.

Aunque el subtipo *stx1a* fue predominante, todas las cepas STEC *stx2*<sup>+</sup> (37,5%) pertenecían a los subtipos *stx2a* o *stx2d*, algunas de ellas asociadas a los serotipos O91:H21 y O55:H8, y eran portadoras de multirresistencias, por lo que comúnmente se asocian con enfermedades graves humanas. Su amplia distribución tanto en la leche de tanque como en el ambiente de las explotaciones (operarios, aire, pienso y heces de vaca) muestra la importancia de mantener prácticas higiénicas adecuadas para impedir o minimizar la contaminación de la leche de vaca y, consecuentemente, disminuir el potencial riesgo para la salud de este grupo patógeno tanto en la leche como en los productos derivados sin tratamiento térmico.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 68–73. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.014
- Akiyama, Y., Futai, H., Saito, E., Ogita, K., Sakae, H., Fukunaga, M., Tsuji, H., Chikahira, M., Iguchi, A., 2017. Shiga toxin subtypes and virulence genes in *Escherichia coli* isolated from cattle. *Jpn. J. Infect. Dis.* 70, 181–185. doi:10.7883/yoken.JJID.2016.100
- Álvarez-Suárez, M.-E., Otero, A., García-López, M.-L., Dahbi, G., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J., Santos, J.A., 2016. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *Int. J. Food Microbiol.* 236, 148–154. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.035
- Amagliani, G., Rotundo, L., Carloni, E., Omiccioli, E., Magnani, M., Brandi, G., Fratamico, P., 2018. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in ground beef and bean sprouts: Evaluation of culture enrichment conditions. *Food Res. Int.* 103, 398–405. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.059
- Askari Badouei, M., Morabito, S., Najafifar, A., Mazandarani, E., 2016. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin gene (EHEC- *hlyA* )-harboring isolates from cattle reveals a diverse origin and hybrid diarrheagenic strains. *Infect. Genet. Evol.* 39, 342–348. doi:10.1016/j.meegid.2016.02.002
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 200, 31–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.018
- Beutin, L., Montenegro, M. a, Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2559–2564.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Aldick, T., Schurk-Bulgrin, R., Karch, H., 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: Predictor for a severe clinical outcome. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1160–1167. doi:10.1086/508195
- 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. *J. Infect. Dis.* 192, 1422–1429. doi:10.1086/466536

## Capítulo II. Caracterización y relaciones genéticas de cepas STEC de origen vacuno

- Buven, G., De Gheldre, Y., Dediste, A., de Moreau, A.-I., Mascart, G., Simon, A., Allemeersch, D., Scheutz, F., Lauwers, S., Pierard, D., 2012. Incidence and virulence determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* Infections in the Brussels-capital region, Belgium, in 2008-2010. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1336–1345. doi:10.1128/JCM.05317-11
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558. doi:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000
- CLSI, 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EE.UU.
- Costard, S., Espejo, L., Groenendaal, H., Zgmutt, F.J., 2017. Outbreak-related disease burden associated with consumption of unpasteurized cow's milk and cheese, United States, 2009-2014. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 957–964. doi:10.3201/eid2306.151603
- da Costa, P., Loureiro, L., Matos, A., 2013. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 278–294. doi:10.3390/ijerph10010278
- de Boer, R.F., Ferdous, M., Ott, A., Scheper, H.R., Wisselink, G.J., Heck, M.E., Rossen, J.W., Kooistra-Smid, A.M.D., 2015. Assessing the public health risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by use of a rapid diagnostic screening algorithm. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1588–1598. doi:10.1128/JCM.03590-14
- Duriez, P., Topp, E., 2007. Temporal dynamics and impact of manure storage on antibiotic resistance patterns and population structure of *Escherichia coli* isolates from a commercial swine farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5486–5493. doi:10.1128/AEM.00218-07
- Eblen, D.R., 2007. Public health importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* ( non-O157 STEC ) in the US food supply [WWW Document]. URL [https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/9e41f955-a919-44fb-98b7-9e2218805ecf/STEC\\_101207.pdf?MOD=AJPERES](https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/9e41f955-a919-44fb-98b7-9e2218805ecf/STEC_101207.pdf?MOD=AJPERES) (accessed 12.13.17).
- EFSA, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14, 1–231. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- EFSA, ECDC, 2017. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA J.* 15, 1–212. doi:10.2903/j.efsa.2017.4694
- EUCAST, 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1. [WWW Document]. URL [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_7.1\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf) (accessed 7.2.17).

## Capítulo II. Caracterización y relaciones genéticas de cepas STEC de origen vacuno

- EUCAST, 2015. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Diseases 5, 1–21.
- EUCAST, 2013. Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Diseases 1, 1–40.
- Fratamico, P.M., Bagi, L.K., Bush, E.J., Solow, B.T., 2004. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7173–7178. doi:10.1128/AEM.70.12.7173-7178.2004
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Vernozy-Rozand, C., 2008. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. Vet. Microbiol. 132, 1–18. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.015
- 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. J. Infect. Dis. 185, 74–84. doi:10.1086/338115
- Fruth, A., Prager, R., Tietze, E., Rabsch, W., Flieger, A., 2015. Molecular epidemiological view on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing human disease in Germany: Diversity, prevalence, and outbreaks. Int. J. Med. Microbiol. 305, 697–704. doi:10.1016/j.ijmm.2015.08.020
- Girardeau, J.P., Dalmaso, 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. J. Clin. Microbiol. 43, 6098–6107. doi:10.1128/JCM.43.12.6098-6107.2005
- Gómez, V.G., 2017. Caracterización de cepas de origen aviar de *Escherichia coli* productoras de B-lactamasas de espectro extendido y del grupo clonal de alto riesgo ST131. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Gonzalez, A.G.M., Cerqueira, A.M.F., Guth, B.E.C., Coutinho, C.A., Liberal, M.H.T., Souza, R.M., Andrade, J.R.C., 2016. Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. J. Appl. Microbiol. 121, 1130–1143. doi:10.1111/jam.13230
- Gould, L.H., Mody, R.K., Ong, K.L., Clogher, P., Cronquist, A.B., Garman, K.N., Lathrop, S., Medus, C., Spina, N.L., Webb, T.H., White, P.L., Wymore, K., Gierke, R.E., Mahon, B.E., Griffin, P.M., 2013. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. Foodborne Pathog. Dis. 10, 453–460. doi:10.1089/fpd.2012.1401

## Capítulo II. Caracterización y relaciones genéticas de cepas STEC de origen vacuno

- Guinée, P.A.M., Jansen, W.H., Wadström, T., Sellwood, R., 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves, in: de Leeuw, P.W., Guinée, P.A.M. (Eds.), Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea: Proceedings of a Workshop on Diagnostic Techniques for Enteropathogenic Agents Associated with Neonatal Diarrhoea in Calves and Pigs, Held at the Central Veterinary Institute, Department of Virology. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 126–162. doi:10.1007/978-94-009-8328-1\_18
- Gyles, C.L., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J. Anim. Sci. 85, 45–62. doi:10.2527/jas.2006-508
- Harrigan, W., 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology, 3rd ed. Academic Press, London.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Mol. Biol. Evol. 23, 254–267. doi:10.1093/molbev/msj030
- Hussein, H.S., Sakuma, T., 2005. Invited Review: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. J. Dairy Sci. 88, 450–465. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72706-5
- Jajarmi, M., Imani Fooladi, A.A., Badouei, M.A., Ahmadi, A., 2017. Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle in Iran. Microb. Pathog. 109, 274–279. doi:10.1016/j.micpath.2017.05.041
- Jolley, K.A., Feil, E.J., Chan, M.S., Maiden, M.C., 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START). Bioinformatics 17, 1230–1231.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2, 123–140. doi:10.1038/nrmicro818
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, 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. J. Clin. Microbiol. 41, 4930–4940. doi:10.1128/JCM.41.11.4930-4940.2003
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18, 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

## Capítulo II. Caracterización y relaciones genéticas de cepas STEC de origen vacuno

- Majowicz, S.E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J.M., Stapleton, J., Angulo, F.J., Yeung, D.H., Kirk, M.D., 2014. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 447–455. doi:10.1089/fpd.2013.1704
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 99–104. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.041
- Mohammadi, P., Abiri, R., Rezaei, M., Salmanzadeh-ahrabi, S., 2013. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk in Kermanshah, Iran. *Iran. J. Microbiol.* 5, 233–238.
- Monaghan, A., Byrne, B., Fanning, S., Sweeney, T., McDowell, D., Bolton, D.J., 2011. Serotypes and virulence profiles of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8662–8668. doi:10.1128/AEM.06190-11
- Monstein, H.-J., Ostholm-Balkhed, A., Nilsson, M. V, Nilsson, M., Dornbusch, K., Nilsson, L.E., 2007. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *blaSHV*, *blaTEM* and *blaCTX-M* genes in Enterobacteriaceae. *APMIS* 115, 1400–1408. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x
- Nagy, B., Szmolka, A., Smole Možina, S., Kovač, J., Strauss, A., Schlager, S., Beutlich, J., Appel, B., Lušický, M., Aprikian, P., Pászti, J., Tóth, I., Kugler, R., Wagner, M., 2015. Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 52–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.026
- Nakano, M., Iida, T., Honda, T., 2004. Urease activity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* depends on a specific one-base substitution in *ureD*. *Microbiology* 150, 3483–3489. doi:10.1099/mic.0.27280-0
- Olsen, J., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P., Popovic, T., Rasmussen, H., Olsvik, Ø., 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 1–78. doi:10.1016/0168-1605(94)00159-4
- Orth, D., Grif, K., Khan, A.B., Naim, A., Dierich, M.P., Würzner, R., 2007. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59, 235–242. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.013

- Otero, V., Sánchez, S., Herrera-León, S., Rodríguez-Calleja, J.-M., Otero, A., García-López, M.-L., Santos, J.A., 2017. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bulk tank ewes' milk and sheep farm environment. *Small Rumin. Res.* 154, 110–114. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.08.002
- Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M.M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., Rossolini, G.M., 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4264–4269. doi:10.1128/JCM.41.9.4264–4269.2003
- Paton, A.W., Paton, J.C., 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 271–274. doi:10.1128/JCM.40.1.271-274.2002
- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598–602.
- 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 toxigenic *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 200, 35–46. doi:10.1084/jem.20040392
- Persad, A.K., LeJeune, J.T., 2014. Animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–14. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014
- Persson, S., Olsen, K.E.P., Ethelberg, S., Scheutz, F., 2007. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (Verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2020–2024. doi:10.1128/JCM.02591-06
- Pollard, D.R., Johnson, W.M., Lior, H., Tyler, S.D., Rozee, K.R., 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 540–545.
- Poyart, C., Mugnier, P., Quesne, G., Berche, P., Trieu-Cuot, P., 1998. A novel extended-spectrum TEM-type beta-lactamase (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 108–113.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1023–1031.
- Preußel, K., Höhle, M., Stark, K., Werber, D., 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 is more likely to lead to hospitalization and death than non-O157 serogroups--except O104. *PLoS One* 8, e78180. doi:10.1371/journal.pone.0078180

- Pulsenet International, 2013. Standard operating procedure for pulsenet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* [WWW Document]. URL [http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05\\_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf](http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf) (accessed 7.2.17).
- Rao, T.S., Gil, J.P.S., Kumar, G.V.V.P.S.R., Ghatak, S., 2011. Multi drug resistance patterns of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and non-STEC isolates from meats, RTE meat foods, drinking water and human diarrhoeic samples of Punjab, India. *Arch. Clin. Microbiol.* 2, 1–12. doi:10.3823/225
- Rolain, J.-M., 2013. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Front. Microbiol.* 4, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2013.00173
- Scheutz, F., 2014. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–15. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0019-2013
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A.D., 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2951–2963. doi:10.1128/JCM.00860-12
- Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H., 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63, 1055–1061.
- Shen, J., Rump, L., Ju, W., Shao, J., Zhao, S., Brown, E., Meng, J., 2015. Virulence characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from food, humans and animals. *Food Microbiol.* 50, 20–27. doi:10.1016/j.fm.2015.02.007
- Solomakos, N., Govaris, A., Angelidis, A.S., Pournaras, S., Burriel, A.R., Kritas, S.K., Papageorgiou, D.K., 2009. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food Microbiol.* 26, 865–871. doi:10.1016/j.fm.2009.06.002
- Spinale, J.M., Ruebner, R.L., Copelovitch, L., Kaplan, B.S., 2013. Long-term outcomes of Shiga toxin hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 28, 2097–2105. doi:10.1007/s00467-012-2383-6
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Thapaliya, D., Hanson, B.M., Kates, A., Klostermann, C.A., Rajeshwari Nair, S.E.W., Smith, T.C., 2015. Zoonotic diseases of swine: Food-borne and occupational aspects of infection, in: Sing, A. (Ed.), *Zoonoses—Infections Affecting Humans and Animals*. Springer, New York, pp. 23–68.

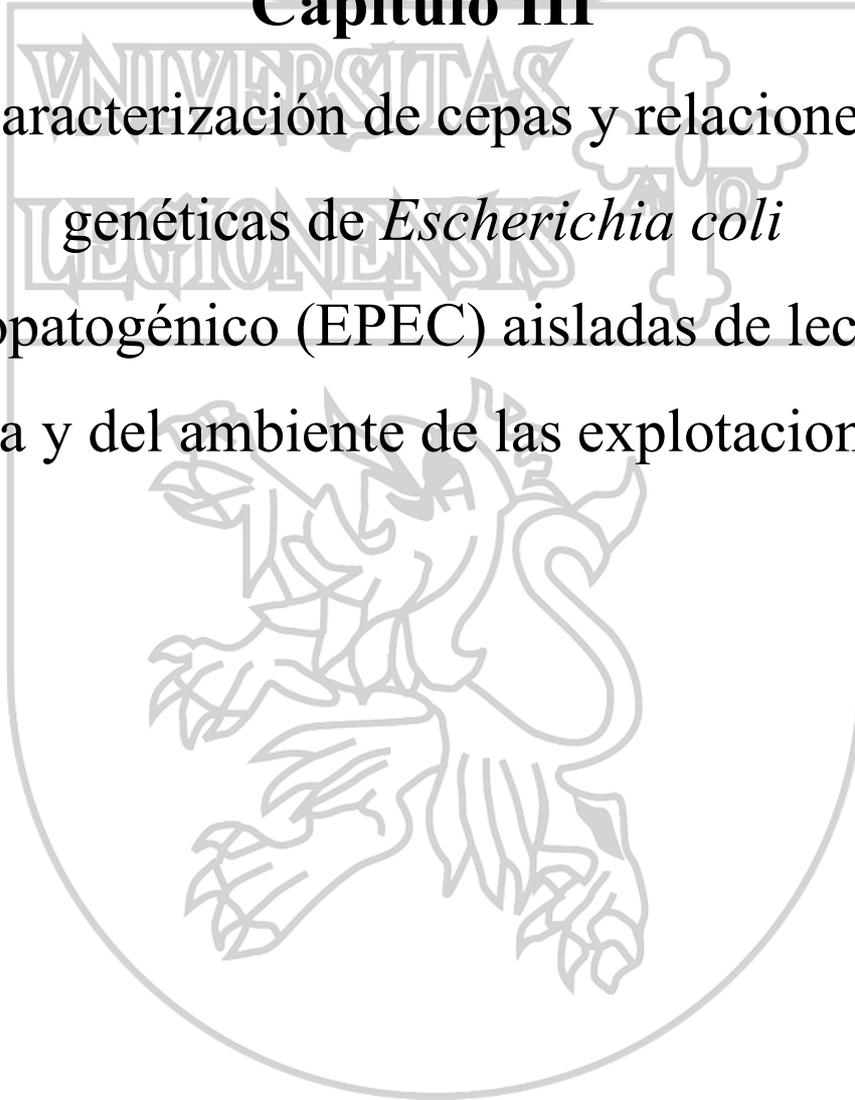
- Tozzoli, R., Caprioli, A., Cappannella, S., Michelacci, V., Marziano, M.L., Morabito, S., 2010. Production of the subtilase AB5 cytotoxin by Shiga toxin-negative *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 48, 178–183. doi:10.1128/JCM.01648-09
- van Asselt, E.D., van der Fels-Klerx, H.J., Marvin, H.J.P., van Bokhorst-van de Veen, H., Groot, M.N., 2017. Overview of food safety hazards in the European dairy supply chain. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 16, 59–75. doi:10.1111/1541-4337.12245
- Wang, F., Yang, Q., Kase, J. a, Meng, J., Clotilde, L.M., Lin, A., Ge, B., 2013. Current trends in detecting non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. Foodborne Pathog. Dis. 10, 665–677. doi:10.1089/fpd.2012.1448
- Wang, G., Clark, C.G., Rodgers, F.G., 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 40, 3613–3619. doi:10.1128/JCM.40.10.3613
- Wani, S.A., Hussain, I., Nabi, A., Fayaz, I., Nishikawa, Y., 2007. Variants of *eae* and *stx* genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from calves. Lett. Appl. Microbiol. 45, 610–615. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02235.x
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol. Microbiol. 60, 1136–1151. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- Zweifel, C., Schumacher, S., Blanco, M., Blanco, J.E., Tasara, T., Blanco, J., Stephan, R., 2005. Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. Vet. Microbiol. 105, 37–45. doi:10.1016/j.vetmic.2004.10.007





## **Capítulo III**

Caracterización de cepas y relaciones genéticas de *Escherichia coli* enteropatogénico (EPEC) aisladas de leche de vaca y del ambiente de las explotaciones.





## 1. INTRODUCCIÓN

EPEC se considera un destacado responsable de diarrea infantil, especialmente en países en vías de desarrollo, y se asocia a la principal causa de muerte en niños con diarrea de moderada a severa (Pearson et al., 2016). Actualmente, son reconocidos 13 serogrupos clásicos de EPEC: O26, O39, O55, O86, O88, O103, O111, O114, O119, O125ac, O126, O127, O128ab, O142, O145, O157 y O158 (Hu y Torres, 2015). Algunos de estos serogrupos se relacionan específicamente con cepas tEPEC que, en la mayor parte de las ocasiones, difieren de los asociados con las cepas aEPEC (Gomes et al., 2004). Una gran cantidad de serogrupos diferentes a los clásicos y cepas no tipables han sido relacionados con aEPEC (Hernandes et al., 2009).

Durante muchos años, tEPEC ha sido considerado el principal agente de diarrea en países en vías de desarrollo mientras que aEPEC se relaciona con diarreas más importantes y de emergencia en países desarrollados (Trabulsi et al., 2002). En los últimos años, la prevalencia de aEPEC ha aumentado, tanto en los países en desarrollo como en aquellos desarrollados (Hu y Torres, 2015). Se han constatado brotes de aEPEC causantes de diarrea en varias partes del mundo, como Finlandia, Japón, China, Corea del Sur y Brasil (Hao et al., 2012; Park et al., 2014; Vieira et al., 2016; Viljanen et al., 1990; Yatsuyanagi et al., 2003), siendo los serogrupos frecuentemente involucrados O157, O127, O111, O108, O39, O33 y O2.

A diferencia de tEPEC cuyo reservorio es casi exclusivamente humano, cepas de aEPEC han sido aisladas tanto de muestras humanas como de animales. Diversos estudios han mostrado la presencia de aEPEC en animales de producción, entre los que se encuentra el vacuno, lo que podría representar una fuente importante de entrada de estas bacterias en la cadena alimentaria (Aidar-Ugrinovich et al., 2007; Bolton et al., 2014; Wani et al., 2009). Además, se han aislado cepas de este patotipo en alimentos de origen animal, como la leche y los productos lácteos derivados (Bandyopadhyay et al., 2012; Beraldo et al., 2014; Cortés et al., 2005; da Silva et al., 2001; Mohammadi y Abiri, 2013; Najand y Ghanbarpour, 2006; Otero et al., 2013) aunque son limitados los

dedicados a determinar su incidencia en muestras de leche de vaca (Barkalita et al., 2016; Carneiro et al., 2006).

La resistencia que presentan algunas bacterias a compuestos antimicrobianos habituales en el tratamiento de enfermedades humanas es un problema global creciente y de enorme importancia. El uso inapropiado de estos agentes es uno de los factores que más han acelerado este fenómeno y, en particular, su utilización abusiva en animales de producción (Allocati et al., 2013; Wang et al., 2017a). Por ello, estas inadecuadas prácticas se han relacionado con la aparición y diseminación de cepas resistentes a antibióticos, incluyendo cepas de EPEC, además de la transmisión de genes de resistencia a otros microorganismos presentes en el ambiente (Ewers et al., 2012; Zhao et al., 2012). Por tanto, resulta importante determinar tanto la presencia de cepas resistentes como sus potenciales vías de diseminación en el ambiente de las explotaciones ganaderas que facilitaría su transmisión a través de la cadena alimentaria.

La aparición de cepas MDR es otro aspecto sanitario que cabe resaltar. Generalmente, se caracteriza por una interacción compleja de diferentes mecanismos que confieren resistencia a una amplia gama de compuestos antimicrobianos. Un mecanismo de resistencia emergente frecuentemente detectado en *E.coli* MDR es la expresión de betalactamasas de espectro extendido y su detección en alimentos es relevante por su repercusión en la salud pública (Nagy et al., 2015).

El objetivo de este capítulo fue doble: a) caracterizar las cepas de EPEC aisladas de leche de vaca y del ambiente de explotaciones de vacuno lechero, estableciendo las posibles fuentes de contaminación mediante la determinación de sus relaciones genéticas por técnicas de tipificación molecular (PFGE y MLST); b) determinar la importancia de la población de EPEC estudiada como portadora de resistencias a compuestos antimicrobianos.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología seguida en este capítulo fue mayoritariamente descrita en el apartado de “Material y Métodos” del Capítulo II de esta Tesis, por lo que los recursos y procedimientos utilizados se presentan a continuación de forma resumida, haciendo especial énfasis en los aspectos diferenciales.

### 2.1. RECUPERACIÓN DE LAS CEPAS EPEC DE ORIGEN VACUNO

Se caracterizaron los aislados presuntos EPEC de los trabajos descritos en el Capítulo I. Un total de 19 cepas de EPEC fueron estudiadas de las que 13 procedían de muestras de leche de tanque y 6 fueron obtenidas de los muestreos del entorno de las explotaciones [heces (n=5) y pienso (n=1)]. Para su posterior caracterización, los aislados congelados a -30 °C fueron recuperados en caldo TSB-YE.

### 2.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

La caracterización bioquímica fue realizada en los medios TSI, LIA, SIM, MIO, SMAC, MR-VP, agar urea, Citrato Simmons y Enterohaemolysina agar.

### 2.3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

En las cepas de EPEC fueron investigados los siguientes genes mediante la técnica de PCR:

- Los genes que codifican para las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*).
- El gen que codifica para la intimina (*eae*) y sus subtipos  $\epsilon 1$ ,  $\zeta$ ,  $\gamma 2$ ,  $k$  y  $\beta 1$ .
- El gen que codifica para la adhesina BFP, *bundle-forming pilus* (*bfpA*).
- El gen que codifica la enterohemolisina (*ehlyA*).
- Los genes *espA* y *espB* (sus variantes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) que codifican para proteínas implicadas en el sistema de secreción tipo III y el gen que codifica para el receptor translocador de intimina *Tir* (sus variantes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ).

Los cebadores utilizados y los productos amplificados para cada gen mediante PCR se presentan en la Tabla III.1.

**Tabla III.1.** Cebadores utilizados para la caracterización genética de las cepas EPEC.

Diana	Cebador	Producto	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb) <sup>1</sup>	Referencia
<i>stx1</i>	stx1F	toxina Shiga 1	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	(Pollard et al., 1990)
	stx1R		AGCGATGCAGCTATTAATAA		
<i>stx2</i>	stx2F	toxina Shiga 2	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	478	(Olsen et al., 1995)
	stx2R		GGATGCATCTCTGGTCATTG		
<i>eae</i>	eaeF	intimina	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	(Paton y Paton, 1998)
	eaeR		CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>bfpA</i>	EP1	adhesina BFP	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	(Gunzburg et al., 1995)
	EP2		GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
<i>ehxA</i>	HlyA-a	enterohemolisina	AGCTGCAAGTGCGGGTCT G	569	(Wang et al., 2002)
	HlyA-b		TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC		
<i>espAα</i>	espA-F	proteína espA subtipo α	TGAGGCATCTAA(AG)G(AC)GTC	269	
	espAα-R		GCTGGCTATTATTGACCG		
<i>espAβ</i>	espA-F	proteína espA subtipo β	TGAGGCATCTAA(AG)G(AC)GTC	101	
	espAβ-R		TGCCTTTCTTATTCTTGTC		
<i>espAγ</i>	espA-F	proteína espA subtipo γ	TGAGGCATCTAA(AG)G(AC)GTC	172	
	espAγ-R		ATCACGAATACCAGTTACCA		
<i>espBα</i>	espB-F	proteína espB subtipo α	GCCGTTTTTGAGAGCCA	94	
	espBα-R		TCCCCAGGACAGATGAGAT		
<i>espBβ</i>	espB-F	proteína espB subtipo β	GCCGTTTTTGAGAGCCA	233	(China, 1999)
	espBβ-R		CTTTTCCGTTGCCTTAGT		
<i>espBγ</i>	espB-F	proteína espB subtipo γ	GCCGTTTTTGAGAGCCA	188	
	espBγ-R		GCACCAGCAGCCTTTGA		
<i>tira</i>	Tir-F	receptor Tir subtipo α	C(AG)CC(TG)CCA(CT)TACCTTCACA	342	
	Tirα-R		CGCTAACCTCCAACCATT		
<i>tirβ</i>	Tir-F	receptor Tir subtipo β	C(AG)CC(TG)CCA(CT)TACCTTCACA	560	
	Tirβ-R		GATTTTTCCCTCGCCACTA		
<i>tiry</i>	Tir-F	receptor Tir subtipo γ	C(AG)CC(TG)CCA(CT)TACCTTCACA	781	
	Tiry-R		GTCGGCAGTTTCAGTTTCAC		
<i>eaeε1</i>	eaeδ/κ_FB	intimina subtipo ε1	AAAACCGCGGAGATGACTTC	722	
	eaeε1_LP5		AGCTCACTCGTAGATGACGGCAAGCG		
<i>eaeζ</i>	eaeζ_Z1	intimina subtipo ζ	GGTAAGCCGTTATCTGCC	206	(Blanco et al., 2004a)
	eaeζ_Z2		ATAGCAAGTGGGGTGAAG		
<i>eaeγ2</i>	eaeδ/κ_FB	intimina subtipo γ2	AAAACCGCGGAGATGACTTC	808	
	eaeθ/γ2_C2		CTGATATTTTATCAGCTTCA		
<i>eaeκ</i>	eaeδ/κ_FB	intimina subtipo κ	AAAACCGCGGAGATGACTTC	833	
	eaeδ/κ_D		CTTGATACACCCGATGGTAAC		
<i>eaeβ1</i>	eaeβ1_B1A	intimina subtipo β1	ACTTCGCCACTTAATGCCAGC	730	(Blanco et al., 2004b)
	eaeβ1_B1B		TTGCAGCACCCCATGTTGAAT		

<sup>1</sup>pb: pares de bases

En la Tabla III.2 se detallan las condiciones específicas que fueron utilizadas para llevar a cabo la técnica de PCR.

**Tabla III.2.** Condiciones utilizadas para la detección de los genes característicos en EPEC mediante PCR.

<i>stx1 y stx2</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	25 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	56°C	72°C	72°C
Tiempo	5 minutos	30 segundos	40 segundos	1 minuto	1,5 minutos
<i>eae</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	94°C	92°C	59°C	72°C	72°C
Tiempo	3 minutos	30 segundos	30 segundos	1 minuto	1,5 minutos
<i>ehlyA</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
Tiempo	8 minutos	30 segundos	30 segundos	30 segundos	7 minutos
<i>bfpA</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	25 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	56°C	72°C	72°C
Tiempo	5 minutos	30 segundos	40 segundos	1 minuto	7 minutos
<i>espA (<math>\alpha</math>, <math>\beta</math> y <math>\gamma</math>)</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	94°C	94°C	48°C	72°C	72°C
Tiempo	5 minutos	30 segundos	30 segundos	30 segundos	7 minutos
<i>espB (<math>\alpha</math>, <math>\beta</math> y <math>\gamma</math>) y tir (<math>\alpha</math>, <math>\beta</math> y <math>\gamma</math>)</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	94°C	94°C	50°C	72°C	72°C
Tiempo	5 minutos	30 segundos	30 segundos	30 segundos	7 minutos
<i>eae<math>\beta</math>1 y eae<math>\beta</math>1</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	94°C	95°C	66°C	72°C	72°C
Tiempo	2 minutos	1 minuto	40 segundos	1 minuto	5 minutos
<i>eae<math>\zeta</math></i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	94°C	94°C	62°C	72°C	72°C
Tiempo	2 minutos	1 minuto	30 segundos	1 minuto	5 minutos
<i>eae<math>\gamma</math>2</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C
Tiempo	2 minutos	1 minuto	30 segundos	1 minuto	5 minutos
<i>eae<math>\kappa</math></i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	94°C	95°C	60°C	72°C	72°C
Tiempo	2 minutos	1 minuto	30 segundos	1 minuto	5 minutos

## 2.4. PRUEBAS SEROLÓGICAS

La determinación de los antígenos O y H se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia para la detección de *E. coli* de Lugo (LREC).

## 2.5. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Se determinó la resistencia de las cepas EPEC a un total de 22 compuestos antimicrobianos mediante el método de difusión en agar de acuerdo a las normas EUCAST (2015). Además, se realizaron las pruebas para la detección de cepas con capacidad para producir BLEE y de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, y *bla*<sub>CTX-M</sub>, de acuerdo a las indicaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016) y EUCAST.

## 2.6. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS DE *E. COLI*

Las cepas fueron agrupadas en alguno de los cuatro grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2 y D) en base a la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y *TSPE4C2* (Clermont et al., 2000).

## 2.7. TIPIFICACIÓN MEDIANTE PFGE

Se determinaron los patrones de macrorrestricción del ADN de las 19 cepas de EPEC mediante la técnica de PFGE. Para ello, se siguió la metodología descrita en la red PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org>) para STEC no-O157 (Pulsenet International, 2013) como se describió en el apartado “Material y Métodos” del Capítulo II.

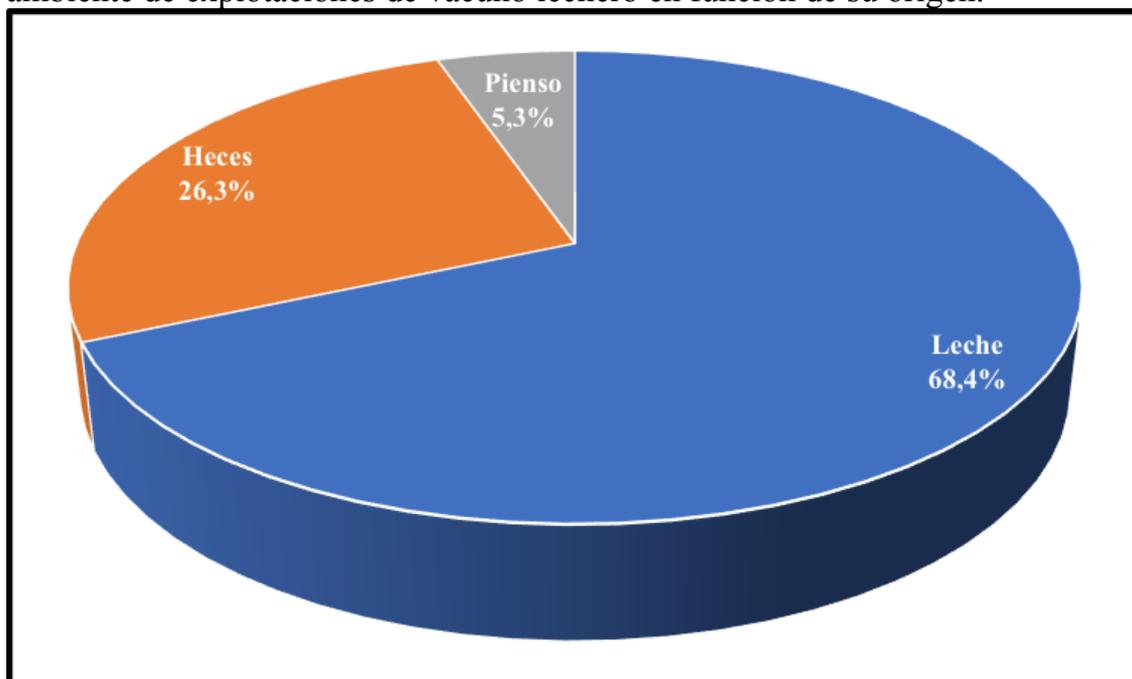
## 2.8. TIPIFICACIÓN MEDIANTE MLST

La amplificación, purificación y secuenciación de los siete genes *housekeeping* (esquema Achtman; *adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) fue realizada de acuerdo al protocolo adoptado del portal MLST de la Universidad de Warwick (<http://enterobase.warwick.ac.uk>).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fueron caracterizadas 19 cepas de EPEC aisladas de 13 muestras de leche de vaca (68,4%) y de seis muestras ambientales (31,6%) de heces de las camas de los animales y pienso tomadas en varias explotaciones de vacuno lechero (Figura III.1).

**Figura III.1.** Distribución de cepas de EPEC aisladas en muestras de leche y ambiente de explotaciones de vacuno lechero en función de su origen.



#### 3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE CEPAS DE EPEC.

Todas cepas de EPEC presentaron características típicas de *E. coli*, fermentando la lactosa, positivas en la prueba del RM e indol, y negativas en las pruebas del VP, producción de H<sub>2</sub>S y utilización del citrato y la urea. Además, el 89,5% (17/19) de las cepas fueron capaces de descarboxilar la lisina y el 84,2% (16/19) también mostraron esta capacidad para la ornitina. Por otro lado, solo la cepa MK13C16 (5,3%) fue incapaz de utilizar el sorbitol, principal característica del serotipo de STEC O157:H7, lo que ya fue observado en el

12,5% de las cepas de aEPEC (sorbitol negativas) aisladas de niños enfermos en Seattle (Bokete et al. 1997).

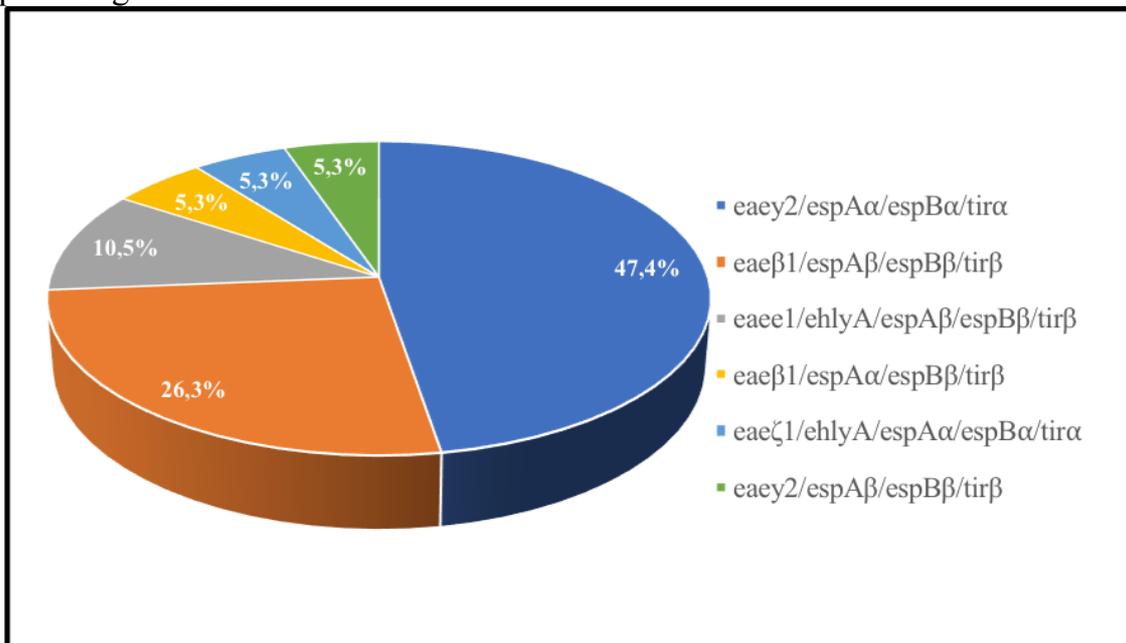
En la Figura III.2 se presenta la distribución de los perfiles genéticos asociados a las cepas de EPEC investigadas.

Las 19 cepas de EPEC (*eae<sup>+</sup>/stx<sup>-</sup>*) aisladas fueron negativas para el gen *bfpA* y, por lo tanto, se consideraron aEPEC (Tabla III.3). Los perfiles de genes de virulencia determinados en las cepas aEPEC estudiadas fueron *eae<sub>γ2</sub>/espA<sub>α</sub>/espB<sub>α</sub>/tir<sub>α</sub>* (47,3%; 9/19), seguido de *eae<sub>β1</sub>/espA<sub>β</sub>/espB<sub>β</sub>/tir<sub>β</sub>* (26,3%; 5/19), *eae<sub>ε1</sub>/ehlyA/espA<sub>β</sub>/espB<sub>β</sub>/tir<sub>β</sub>* (10,5%; 2/19), *eae<sub>β1</sub>/espA<sub>α</sub>/espB<sub>β</sub>/tir<sub>β</sub>* (5,3%; 1/19), *eae<sub>ζ1</sub>/ehlyA/espA<sub>α</sub>/espB<sub>α</sub>/tir<sub>α</sub>* (5,3%; 1/19) y *eae<sub>γ2</sub>/espA<sub>β</sub>/espB<sub>β</sub>/tir<sub>β</sub>* (5,3%; 1/19). Por lo tanto, todos los aislados portaban los genes *tir*, *espA* y *espB* y con una mayor prevalencia del subtipo  $\alpha$  en los tres genes (52,6%; 57,9% y 52,6%; respectivamente).

El gen responsable de la producción de la enterohemolisina (*ehlyA*) se presentó en tan solo tres cepas de aEPEC. El subtipo *eae<sub>β1</sub>* de la intimina fue determinado en seis cepas de aEPEC (31,6%) procedentes de leche de vaca que no pertenecían a los serotipos clásicos de EPEC, según se describirá en los apartados siguientes. Este subtipo es el más común entre cepas de EPEC de origen humano (Contreras et al., 2010; Vieira et al., 2016; Xu et al., 2016), y nuestros resultados indican que este subtipo fue frecuente en las cepas aisladas de muestras de leche de vaca.

El elevado número de perfiles (6) de virulencia, considerando las diferentes variantes genéticas, entre las 19 cepas aEPEC estudiadas en este trabajo muestran su gran diversidad que parece ser una característica frecuente en este patotipo de *E. coli* (Hernandes et al., 2009).

**Figura III.2.** Distribución de las cepas de aEPEC estudiadas en función de sus perfiles genéticos de virulencia.



La agrupación filogenética de los 19 aislados aEPEC mostró que 15 (78,9%) pertenecían al grupo filogenético A, todos menos uno obtenidos de leche de vaca. Las cuatro cepas restantes (21,1%), que fueron aisladas de heces de las camas de los animales, se incluyeron en los grupos B1, B2 y D (Tabla III.3). Independientemente del grupo filogenético determinado, es notable destacar que todas las cepas estudiadas tenían más de uno de los factores de virulencia examinados como ya se describió anteriormente.

**Tabla III.3.** Genes de virulencia y perfiles de resistencias antimicrobianas de cepas de aEPEC aisladas de explotaciones de vacuno lechero.

Cepa	Origen	Genes de virulencia						Grupo filogenético	Resistencia a antimicrobianos	
		<i>eae</i> ( $\epsilon$ 1/ $\beta$ 1/ $\gamma$ 2/ $\zeta$ 1/ $\kappa$ )	<i>bfpA</i>	<i>ehlyA</i>	<i>espA</i> ( $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ )	<i>espB</i> ( $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ )	<i>tir</i> ( $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ )		Perfil <sup>1</sup>	Genes ( <i>bla</i> <sub>SHV</sub> / <i>bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> )
MK7C17	Leche	$\beta$ 1	-	-	$\beta$	$\beta$	$\beta$	A	- <sup>2</sup>	- <sup>3</sup>
MK13C16	Leche	$\zeta$ 1	-	+	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	A	-	-
MK16C5	Leche	$\beta$ 1	-	-	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	A	-	-
MK50C8	Leche	$\beta$ 1	-	-	$\beta$	$\beta$	$\beta$	A	-	-
MK110C3	Leche	$\gamma$ 2	-	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	A	-	-
MK116C9	Leche	$\gamma$ 2	-	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	A	-	-
MK127C9	Leche	$\beta$ 1	-	-	$\beta$	$\beta$	$\beta$	A	-	-
MK130C20	Leche	$\beta$ 1	-	-	$\beta$	$\beta$	$\beta$	A	-	-
MK150C20	Leche	$\gamma$ 2	-	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	A	-	-
MK163C15	Leche	$\gamma$ 2	-	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	A	S/TE/SXT/SSS	-
MK169C17	Leche	$\gamma$ 2	-	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	A	CN	-
MK202C5	Leche	$\gamma$ 2	-	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	A	-	-
MK212C3	Leche	$\beta$ 1	-	-	$\beta$	$\beta$	$\beta$	A	-	-
P4C16	Pienso	$\gamma$ 2	-	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	A	-	-
H4C12	Heces	$\epsilon$ 1	-	+	$\beta$	$\beta$	$\beta$	A	AMP/S/TE/ AMC/SXT/SSS/TIC/PRL	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>+</sup>
H5C24	Heces	$\gamma$ 2	-	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	B1	-	-
H8C5	Heces	$\gamma$ 2	-	-	$\beta$	$\beta$	$\beta$	D	AMP/KF/AMC	-
H8C4	Heces	$\gamma$ 2	-	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	B2	KF	-
H10C1	Heces	$\epsilon$ 1	-	+	$\beta$	$\beta$	$\beta$	B1	AMP/S/KF/TE/ AMC/SXT/SSS/TIC/PRL	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>+</sup>

<sup>1</sup> perfil de resistencia antimicrobiana, abreviaturas de acuerdo a la Tabla II.3 del Capítulo II.

<sup>2</sup> -, sensible a todos los antibióticos probados (n=22).

<sup>3</sup> -, genes de resistencia investigados no detectados.

### 3.2.DISTRIBUCIÓN SEROLÓGICA DE CEPAS aEPEC EN EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO.

Las 19 cepas aEPEC se clasificaron en nueve serotipos diferentes según se presenta en la Tabla III.4.

El serotipo más frecuente fue el O156:H8, que se asoció a cinco cepas aisladas de muestras de leche de vaca ampliamente distribuidas en otras tantas explotaciones. Los serogrupos O156 y O26 fueron relacionados por Orden et al. (2002) como los más prevalentes en bovinos sanos en España.

El serogrupo O2, que se ha asociado estrechamente a cepas aEPEC aisladas de leche (Barkalita et al., 2016), no fue determinado en ninguna de las cepas estudiadas en esta Tesis. En nuestro trabajo, el 42% de los aislados de aEPEC no fueron tipables para el antígeno somático O, tasa muy superior al 20% que se han determinado en otros trabajos previos (Hernandes et al., 2009; Trabulsi et al., 2002). El resto de cepas aEPEC analizadas se clasificaron en serogrupos O no clásicos, que puede ser un resultado esperado debido a la gran diversidad de serogrupos de cepas aEPEC relacionados en la bibliografía científica. A este hecho se le puede atribuir una importancia clínica relativa ya que los serogrupos de EPEC no clásicos han sido altamente prevalentes en niños menores de dos años con gastroenteritis aguda (Prère et al., 2006).

Siete aEPEC (37,8%) obtenidas de muestras de leche presentaron el antígeno H2 y otras tres cepas (15,8%), aisladas de heces, leche y pienso, se clasificaron como no móviles (HNM). Es frecuente que los antígenos H6 y H2 sean asociados con EPEC (Trabulsi et al., 2002).

Se ha puesto de manifiesto que cepas EPEC del mismo serotipo albergan subtipos de intimina idénticos y, al contrario, pocos serotipos de aEPEC incluyen cepas con diferentes subtipos de intimina (Hernandes et al., 2009). En nuestros resultados observamos que cada serotipo de aEPEC está asociado al mismo subtipo de intimina, por ejemplo, todas las cepas aEPEC del serotipo O156:H8 presentaron el subtipo *eae*<sub>2</sub> (Tablas III.3 y III.4). En el mismo sentido, se detectó un único perfil de genes de virulencia en las cepas asociadas al mismo serotipo.

**Tabla III.4.** Distribución serológica de cepas aEPEC en diferentes orígenes de explotaciones de vacuno lechero de Castilla y León.

Serotipo	Cepa	Explotación	Origen <sup>1</sup>		
			Leche	Heces	Pienso
O4:H2	H4C12	F-B		X	
	Ha10C1	F-B		X	
O15:H2	MK7C17	F-F	X		
	MK50C8	F-C	X		
O69:HNM	H8C5	F-D		X	
O146:H21	MK202C5	F-N	X		
O156:H8	MK110C3	F-I	X		
	MK116C9	F-C	X		
	MK150C20	F-K	X		
	MK163C15	F-L	X		
	MK169C17	F-M	X		
ONT:H2	MK127C9	F-B	X		
	MK130C20	F-J	X		
	MK212C3	F-O	X		
ONT:H7	Ha8C4	F-D		X	
ONT:H8	H5C24	F-E		X	
ONT:H25	MK13C16	F-G	X		
ONT:HNM	MK16C5	F-H	X		
	P4C16	F-B			X

<sup>1</sup>No se aislaron cepas de muestras de aire, operarios o agua de bebida de los animales.

### 3.3.RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS DE CEPAS aEPEC AISLADAS DE EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO.

Los patrones de resistencia a los 22 compuestos antimicrobianos probados en las 19 cepas aEPEC se muestran en la Tabla III.3.

Una tasa moderada de estas cepas (31,5%; 6/19) mostró al menos resistencia a una sustancia antimicrobiana, de las que cuatro fueron resistentes a tres o más antibióticos. Estos datos de incidencia de resistencias en EPEC son similares a los indicados por otros autores (Bolton et al., 2014; Scaletsky et al., 2010).

La mayor prevalencia de resistencia entre las 22 sustancias antimicrobianas probadas fue determinada en estreptomicina, tetraciclina, cefalotina, trimetoprim, sulfonamidas, amoxicilina y ampicilina (50%, respectivamente), seguido por ticarcilina y piperacilina (33,3%, respetivamente) y gentamicina (16,7%). La mitad de las cepas aEPEC que mostraron resistencia (cepas MK163C15, H4C12 y H10C1) compartían un patrón de MDR que incluía aminoglucósidos (estreptomicina), tetraciclinas, cefalosporinas (cefalotina) y sulfonamidas. La resistencia a tetraciclina, ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y trimetoprim entre cepas de EPEC y otras DEC aisladas de alimentos parece ser bastante frecuente como se ha puesto de manifiesto en varios trabajos (Scaletsky et al., 2010; Teophilo et al., 2002; Wang et al., 2017b). Así mismo, todos los aislados de aEPEC fueron sensibles al cloranfenicol como también se observa frecuentemente en cepas DEC de origen alimentario (Beraldo et al., 2014; Bolton et al., 2014; Gómez-Aldapa et al., 2016).

Los aislados H10C1 y H4C12, que forman el perfil de alelos 17 según se presentará en el apartado siguiente, mostraron un patrón de MDR compuesto por nueve y ocho antibióticos, respectivamente, y fueron positivas para el gen *bla<sub>TEM</sub>* que se relaciona con la producción de BLEE (Monstein et al., 2007). Estas cepas fueron resistentes al aztreonam en las pruebas iniciales de sensibilidad, lo que no era de esperar a la vista de los datos reflejados en otros estudios que muestran una total o alta susceptibilidad a este compuesto en cepas EPEC aisladas de

alimentos (Wang et al., 2017a, 2017b). Sin embargo, estas dos cepas no se confirmaron como productoras de BLEE mediante las pruebas fenotípicas confirmativas.

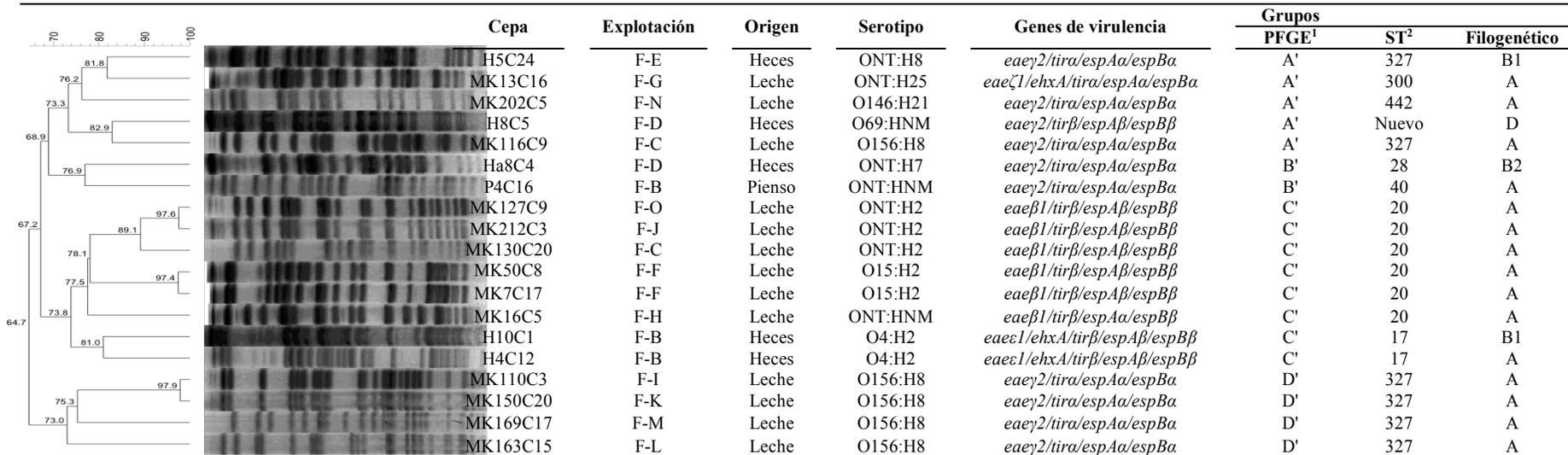
Por lo tanto, aunque la incidencia de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido es emergente en microorganismos entéricos, las cepas estudiadas en este capítulo no fueron confirmadas como poseedoras de esta capacidad.

### 3.4. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS aEPEC AISLADAS DE EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO.

El análisis de ADN cromosómico mediante *Xba*I-PFGE distinguió 4 pulsotipos con un coeficiente de similitud mínimo de 73%, identificados por las letras A' a D' según se presenta en la Figura III.3. Los pulsotipos A' (cinco cepas) y C' (ocho cepas) incluían cepas aisladas de leche y heces. El pulsotipo B' agrupó tan solo dos cepas aisladas de heces y pienso de distintas explotaciones, mientras que el grupo D' fue el más homogéneo, conteniendo cuatro cepas de muestras de leche del mismo serotipo (O156:H8) aunque distribuidas en distintas explotaciones.

El análisis de las secuencias de los siete genes *housekeeping* correspondientes a las 19 cepas de aEPEC determinó ocho STs como se recoge en la Tabla III.5. La distribución de STs, junto con información sobre el origen, el serotipo y otras características genéticas, se presentan en la Figura III.3.

**Figura III.3.** Dendrograma obtenido mediante PFGE (*XbaI*) de las 19 cepas de aEPEC de origen vacuno y características asociadas.



<sup>1</sup>Grupos obtenidos mediante PFGE (letras A' a D').

<sup>2</sup>Número identificativo del perfil de alelos o secuencia tipo de acuerdo a la base de datos MLST de Achtman.

**Tabla III.5.** Secuencias tipo (STs), perfiles de alelos y frecuencias obtenidas mediante MLST de 19 cepas de aEPEC.

ST <sup>1</sup>	Perfil de los alelos							Frecuencia (n° de cepas)
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
<b>17</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>2</b>
<b>20</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>18</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
28	13	21	13	22	17	14	15	1
40	6	4	5	26	20	8	14	1
300	77	7	72	18	53	56	7	1
327	6	4	4	85	43	12	7	6
442	6	95	33	18	9	8	14	1
Nuevo	132	163	255	545	110	247	373	1

<sup>1</sup>Número identificativo del perfil de alelos o secuencia tipo de acuerdo a la base de datos MLST de Achtman. En letra negrita se destaca el complejo clonal detectado.

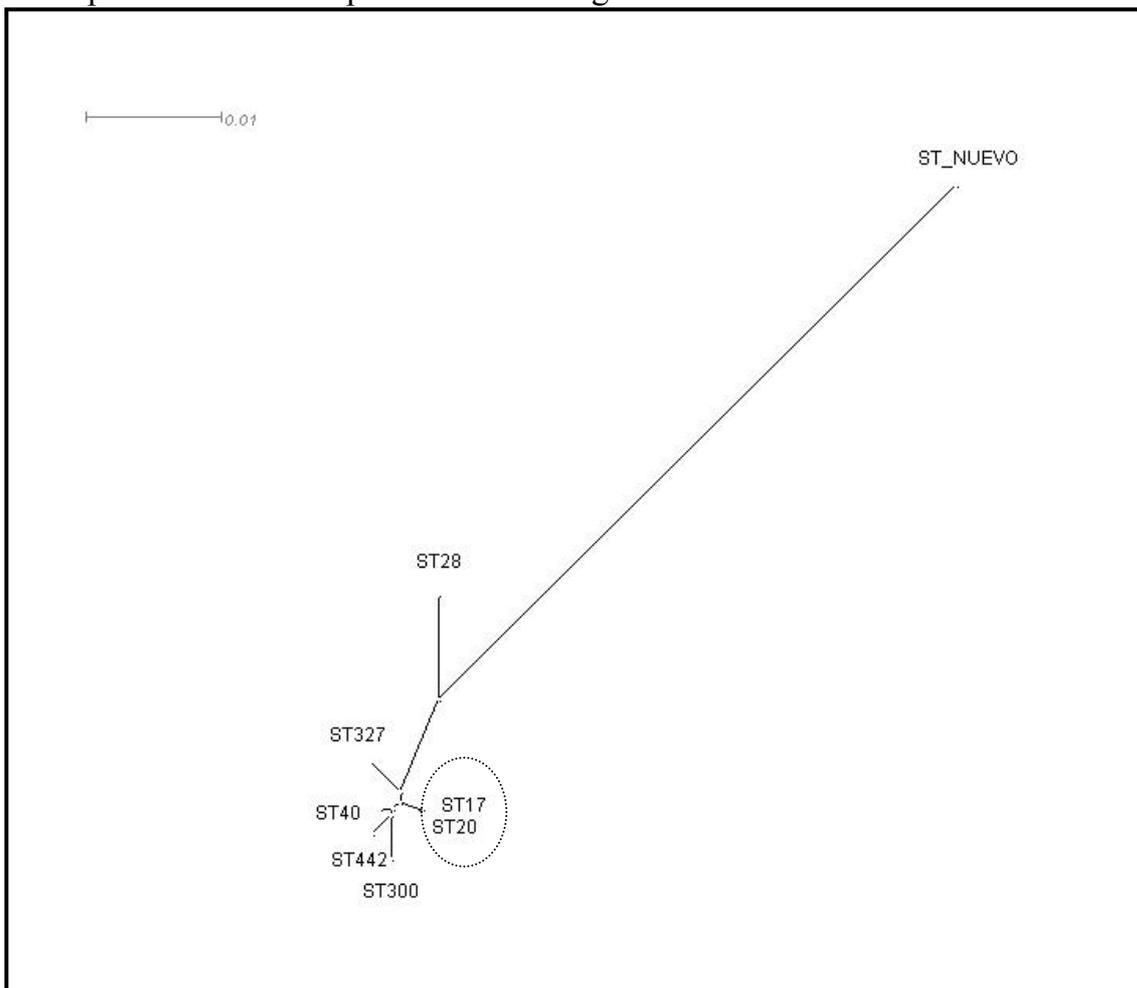
Se determinaron de cuatro a ocho alelos diferentes para cada locus. El *mdh* fue el más variable con ocho alelos mientras que el *adk* fue el más conservado presentando tan solo cuatro tipos diferentes de alelos. A pesar de que no se detectaron nuevos alelos, se encontró un perfil alélico en la cepa H8C5 no registrado en la base de datos MLST (Tabla III.5).

Los perfiles alélicos 20 y 327 fueron los más frecuentes (17,1%) y cada uno agrupó seis cepas de aEPEC obtenidas de leche de vaca, a excepción de la cepa H5C24 (ST 327) aislada de muestras de heces. Las cepas incluidas en estos dos perfiles de alelos predominantes fueron agrupadas en diferentes pulsotipos (C' para el ST 20; A' y D' para el ST 327; Figura III.3).

Todas las cepas del perfil alélico 20 se asociaron con el antígeno H2 a excepción de la cepa MK16C5 que se mostró inmóvil (HNM). El serotipo O156:H8 se determinó en todas las cepas del ST 327, excepto en la cepa H5C24 (ONT:H8). Tanto el ST 20 como el ST 327 se encontraron distribuidos en explotaciones de distintas localidades, lo que indicaría una amplia diseminación de estos STs. Los ST 28, ST 40, ST 300, ST 442 y el ST nuevo incluyeron una cepa cada uno, mientras que el ST 17 agrupó dos cepas.

Solo un complejo clonal fue revelado mediante análisis eBurst, compuesto por el predominante ST 20 y el ST 17 que se corresponden con el pulstotipo C', con una única variante alélica en el *locus icd* (Figura III.4 y Tabla III.5). Este complejo clonal agrupó ocho cepas de aEPEC, obtenidas de leche y heces de las camas de los animales, aisladas de seis explotaciones ubicadas en localidades distintas (Figura III.5).

**Figura III.4.** Red filogenética obtenida con *SplitsTree* de las secuencias tipo correspondientes a 19 cepas aEPEC de origen vacuno.



Así pues, el análisis mediante PFGE mostró una gran diversidad genética que también se observó cuando se estudiaron los polimorfismos en los siete genes *housekeeping* por MLST, que ya ha sido puesta de manifiesto por otros autores en cepas de aEPEC tanto clínicas como aisladas de leche (Afset et al., 2008; Otero et al., 2013).



Al igual que se observó para las cepas de STEC estudiadas en el Capítulo II, los tipos moleculares obtenidos por ambos métodos de tipificación basados en el análisis del ADN bacteriano fueron independientes de los perfiles de resistencia a antibióticos, ya que se determinaron resistencias en cepas incluidas en múltiples pulsotipos o ST. Sin embargo, los perfiles de genes de virulencia fueron característicos para cada secuencia tipo (Figura III.3).

#### 4. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES

Las cepas aEPEC obtenidas del hábitat vacuno presentaron una gran diversidad genética a partir del análisis de macrorrestricción del ADN bacteriano (PFGE) y de los polimorfismos en los siete genes *housekeeping* por MLST.

El 31,5% de las cepas aEPEC fueron resistentes al menos a una de las sustancias antimicrobianas estudiadas. La mitad de estas cepas compartían un patrón de MDR que incluía aminoglucósidos, tetraciclinas, cefalosporinas y sulfonamidas. Dos de estas cepas MDR aisladas de heces configuraron el ST 17 que formó parte de un complejo clonal con cepas contaminantes de la leche de vaca. Así pues, la leche de vaca y las heces del entorno de las explotaciones vacunas, son fuentes de aEPEC portadoras de resistencias antimicrobianas que podrían transmitirse a lo largo de la cadena alimentaria, lo que remarca la necesidad de mantener prácticas correctas ganaderas en la utilización de tratamientos antibióticos.

La estrecha relación genética entre las cepas de aEPEC obtenidas de leche de vaca y de heces, pertenecientes al complejo clonal formado por el ST 20 y el ST 17, con amplia distribución geográfica entre las explotaciones vacunas, agrupadas en el pulsotipo C', y que comparten genes de virulencia y mayoritariamente el antígeno H2, confirma las heces presentes en las camas del ganado vacuno como vehículo principal de contaminación de la leche por este tipo enteropatogénico emergente.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- 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. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2280–2290. doi:10.1128/JCM.01752-07
- Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J.E., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D.L., Silveira, W.D., Pestana de Castro, A.F., 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 297–306. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.046
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., Di Ilio, C., 2013. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 6235–6254. doi:10.3390/ijerph10126235
- Bandyopadhyay, S., Lodh, C., Rahaman, H., Bhattacharya, D., Bera, a K., Ahmed, F. a, Mahanti, A., Samanta, I., Mondal, D.K., Sarkar, S., Dutta, T.K., Maity, S., Paul, V., Ghosh, M.K., Sarkar, M., Baruah, K.K., 2012. Characterization of shiga toxin producing (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in raw yak (*Poephagus grunniens*) milk and milk products. *Res. Vet. Sci.* 93, 604–610. doi:10.1016/j.rvsc.2011.12.011
- Barkalita, L., Sharma, R.K., Borah, P., Kalita, D., Hussain, I., Doley, M.K., Deka, P., Neher, S., 2016. Isolation and molecular characterization of Shigatoxigenic and Enteropathogenic *Escherichia coli* from diverse sources. *J. Anim. Res.* 6, 27–31. doi:10.5958/2277-940X.2016.00005.X
- Beraldo, L.G., Borges, C.A., Maluta, R.P., Cardozo, M.V., Rigobelo, E.C., de Ávila, F.A., 2014. Detection of Shiga toxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. *Vet. Microbiol.* 170, 162–166. doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.023
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., Blanco, J., 2004a. 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-*). *J. Clin. Microbiol.* 42, 645–651. doi:10.1128/JCM.42.2.645-651.2004
- Blanco, M., Padola, N.L., Krüger, A., Sanz, M.E., Blanco, J.E., González, E.A., Dahbi, G., Mora, A., Bernárdez, M.I., Etcheverría, A.I., Arroyo, G.H., Lucchesi, P.M.A., Parma, A.E., Blanco, J., 2004b. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int. Microbiol.* 7, 269–276.

### Capítulo III. Caracterización y relación genética de cepas EPEC de origen vacuno

- Bokete, T.N., Whittam, T.S., Wilson, R. a, Clausen, C.R., O'Callahan, C.M., Moseley, S.L., Fritsche, T.R., Tarr, P.I., 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. *J. Infect. Dis.* 175, 1382–1389.
- Bolton, D.J., Ennis, C., McDowell, D., 2014. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from twelve bovine farms in the north-east of Ireland. *Zoonoses Public Health* 61, 149–156. doi:10.1111/zph.12058
- Carneiro, L.A.M., Lins, M.C., Garcia, F.R.A., Silva, A.P.S., Mauller, P.M., Alves, G.B., Rosa, A.C.P., Andrade, J.R.C., Freitas-Almeida, A.C., Queiroz, M.L.P., 2006. Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 15–21. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.010
- China, B., 1999. Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 177–182. doi:10.1016/S0378-1097(99)00352-3
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558. doi:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000
- CLSI, 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EE.UU.
- Contreras, C.A., Ochoa, T.J., Lacher, D.W., DebRoy, C., Navarro, A., Talledo, M., Donnenberg, M.S., Ecker, L., Gil, A.I., Lanata, C.F., Cleary, T.G., 2010. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *J. Med. Microbiol.* 59, 25–31. doi:10.1099/jmm.0.013706-0
- Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J.E., 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. *Vet. Microbiol.* 110, 67–76. doi:10.1016/j.vetmic.2005.06.009
- da Silva, Z.N., Cunha, A.S., Lins, M.C., de AM Carneiro, L., Almeida, A.C., Queiroz, M.L., 2001. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Rev. Saude Publica* 35, 375–379.
- EUCAST, 2015. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. *Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Diseases* 5, 1–21.

- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L.H., 2012. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: A global perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 646–655. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x
- Gomes, T.A.T., Irino, K., Girão, D.M., Girão, V.B.C., Guth, B.E.C., Vaz, T.M.I., Moreira, F.C., Chinarelli, S.H., Vieira, M.A.M., 2004. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1851–1855. doi:10.3201/eid1010.031093
- Gómez-Aldapa, C.A., Cerna-Cortes, J.F., Rangel-Vargas, E., Torres-Vitela, M.R., Villarruel-López, A., Gutiérrez-Alcántara, E.J., Castro-Rosas, J., 2016. Presence of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli*, on raw nopalitos (*Opuntia ficus-indica* L.) and in nopalitos salads from local retail markets in Mex. *Foodborne Pathog. Dis.* 13, 269–274. doi:10.1089/fpd.2015.2065
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1375–1377.
- Hao, R., Qiu, S., Wang, Y., Yang, G., Su, W., Song, L., Zhang, J., Chen, J., Jia, L., Wang, L., Song, H., 2012. Quinolone-resistant *Escherichia coli* O127a:K63 serotype with an extended-spectrum-beta-lactamase phenotype from a food poisoning outbreak in China. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2450–2451. doi:10.1128/JCM.00276-12
- Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A.M., Gomes, T.A.T., 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 137–149. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x
- Hu, J., Torres, A.G., 2015. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 729–734. doi:10.1016/j.cmi.2015.01.015
- Mohammadi, P., Abiri, R., 2013. Isolation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from raw milk in Kermanshah by polymerase chain reaction (PCR). *Jundishapur J. Microbiol.* 6, 1–4. doi:10.5812/jjm.5439
- Monstein, H.-J., Ostholm-Balkhed, A., Nilsson, M. V, Nilsson, M., Dornbusch, K., Nilsson, L.E., 2007. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *blaSHV*, *blaTEM* and *blaCTX-M* genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 115, 1400–1408. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x
- Nagy, B., Szmolka, A., Smole Možina, S., Kovač, J., Strauss, A., Schlager, S., Beutlich, J., Appel, B., Lušicky, M., Aprikian, P., Pászti, J., Tóth, I., Kugler, R., Wagner, M., 2015. Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 52–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.026

### Capítulo III. Caracterización y relación genética de cepas EPEC de origen vacuno

- Najand, L.M., Ghanbarpour, R., 2006. A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese. *Vet. Arh.* 76, 531–536.
- Olsen, J., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P., Popovic, T., Rasmussen, H., Olsvik, Ø., 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 1–78. doi:10.1016/0168-1605(94)00159-4
- 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 necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *J. Appl. Microbiol.* 93, 29–35. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01649.x
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5864–5869. doi:10.1128/AEM.01809-13
- Park, J.-H., Oh, S.-S., Oh, K.-H., Shin, J., Jang, E.J., Jun, B.-Y., Youn, S.-K., Cho, S.-H., 2014. Diarrheal outbreak caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45 in South Korea. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 775–781. doi:10.1089/fpd.2014.1754
- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598–602.
- Pearson, J.S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., Hartland, E.L., 2016. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu. Rev. Genet.* 50, 493–513. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035138
- Pollard, D.R., Johnson, W.M., Lior, H., Tyler, S.D., Rozee, K.R., 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 540–545.
- Prère, M.F., Bacrie, S.C., Baron, O., Fayet, O., 2006. Bacterial aetiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups. *Pathol. Biol. (Paris).* 54, 600–602. doi:10.1016/j.patbio.2006.07.034
- Pulsenet International, 2013. Standard operating procedure for pulsenet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* [WWW Document]. URL [http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05\\_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf](http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf) (accessed 7.2.17).

### Capítulo III. Caracterización y relación genética de cepas EPEC de origen vacuno

- Scaletsky, I.C.A., Souza, T.B., Aranda, K.R.S., Okeke, I.N., 2010. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. *BMC Microbiol.* 10, 1–5. doi:10.1186/1471-2180-10-25
- Teophilo, G., dos Fernandes Vieira, R., dos Prazeres Rodrigues, D., Menezes, F.R., 2002. *Escherichia coli* isolated from seafood: toxicity and plasmid profiles. *Int. Microbiol.* 5, 11–14. doi:10.1007/s10123-002-0052-5
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Gomes, T.A.T., 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 508–513. doi:10.3201/eid0805.010385
- Vieira, M.A., Gomes, T.A.T., Camargo, C.H., dos Santos, L.F., Hernandez, R.T., Dias, R.C.B., Pinheiro, S.R.S., 2016. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. *J. Med. Microbiol.* 65, 998–1006. doi:10.1099/jmm.0.000313
- Viljanen, M.K., Peltola, T., Kuistila, M., Huovinen, P., Junnila, S., Olkkonen, L., Järvinen, H., 1990. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *Lancet* 336, 831–834. doi:10.1016/0140-6736(90)92337-H
- Wang, G., Clark, C.G., Rodgers, F.G., 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3613–3619. doi:10.1128/JCM.40.10.3613
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y., 2017a. Comparison by multilocus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from food samples and human and animal faecal specimens. *J. Appl. Microbiol.* 122, 268–278. doi:10.1111/jam.13322
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y., 2017b. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *Int. J. Food Microbiol.* 249, 44–52. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.003
- Wani, S.A., Hussain, I., Fayaz, I., Mir, M.A., Nishikawa, Y., 2009. Subtype analysis of *stx1*, *stx2* and *eae* genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lambs in India. *Vet. J.* 182, 489–490. doi:10.1016/j.tvjl.2008.07.017
- Xu, Y., Bai, X., Zhao, A., Zhang, W., Ba, P., Liu, K., Jin, Y., Wang, H., Guo, Q., Sun, H., Xu, J., Xiong, Y., 2016. Genetic diversity of intimin gene of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from human, animals and raw meats in China. *PLoS One* 11, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0152571

### Capítulo III. Caracterización y relación genética de cepas EPEC de origen vacuno

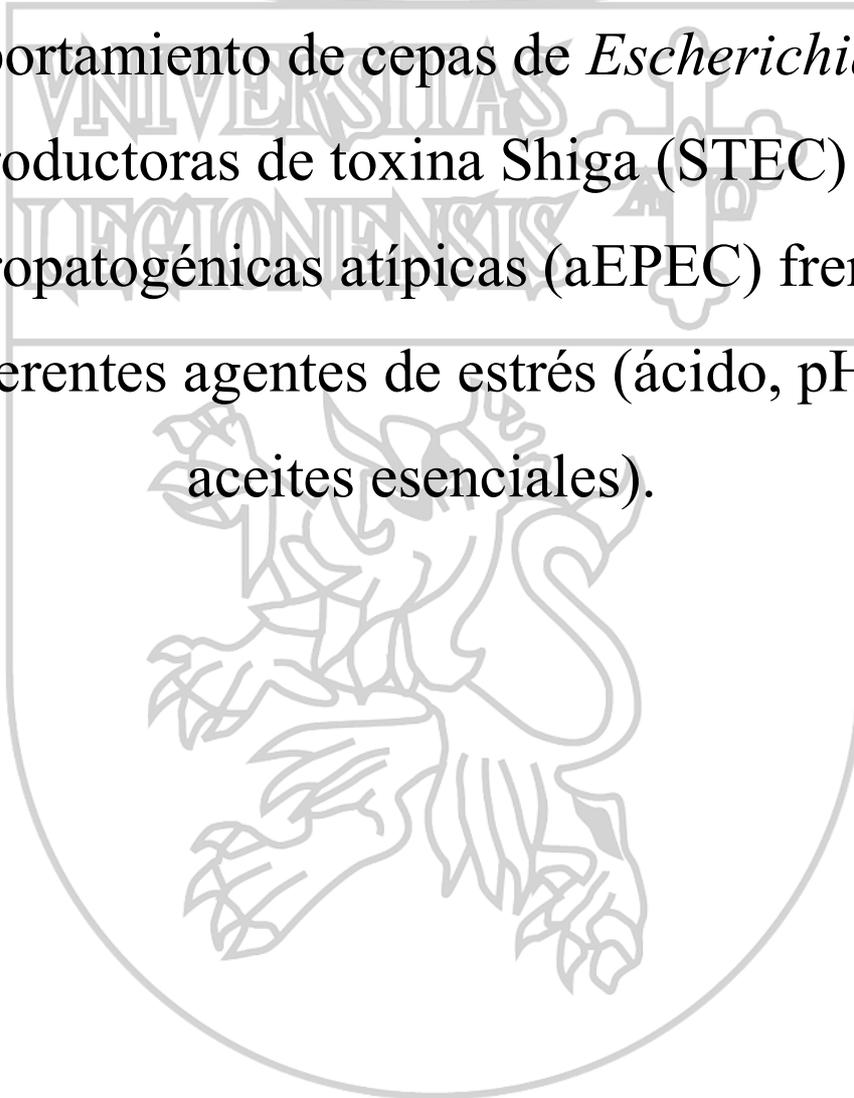
- Yatsuyanagi, J., Saito, S., Miyajima, Y., Amano, K.-I., Enomoto, K., 2003. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2033–2039. doi:10.1128/JCM.41.5.2033-2039.2003
- Zhao, S., Blickenstaff, K., Bodeis-Jones, S., Gaines, S.A., Tong, E., McDermott, P.F., 2012. Comparison of the prevalences and antimicrobial resistances of *Escherichia coli* isolates from different retail meats in the United States, 2002 to 2008. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1701–1707. doi:10.1128/AEM.07522-11





## Capítulo IV

Comportamiento de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) y enteropatógenicas atípicas (aEPEC) frente a diferentes agentes de estrés (ácido, pH y aceites esenciales).





## 1. INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria, la sal, en combinación con otros factores, es utilizada frecuentemente como un agente antimicrobiano (Burgess et al., 2016). Entre varios métodos de conservación, la combinación de ácido y sal es un ejemplo común de la combinación de obstáculos que se utiliza en alimentos acidificados, quesos y productos cárnicos fermentados (Bae y Lee, 2017). Sin embargo, algunas bacterias pertenecientes al grupo de STEC son capaces de sobrevivir a pH bajos (Farrokh et al., 2013), así como en presencia de altas concentraciones de sal (Burgess et al., 2016).

La creciente resistencia de los microorganismos a los productos químicos convencionales ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de agentes antimicrobianos, entre ellas el quitosano y los AE de plantas (Nazzaro et al., 2013). En los últimos años se ha llevado a cabo numerosas investigaciones acerca del uso de AE en la conservación de los productos alimenticios (Pandey et al., 2017). Actualmente son producidos una gran variedad de AE, que pueden ser obtenidos de más de 17.000 plantas aromáticas (Prakash et al., 2015), entre ellos el AE de tomillo presenta un interés especial por la gran cantidad de compuestos con actividad antibacteriana que contiene (Assiri et al., 2016; Burt, 2004), demostrando ser efectivo frente una amplia gama de especies bacterianas tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Villa y Veiga-Crespo, 2014).

El quitosano es un biopolímero natural derivado de la desacetilación de la quitina, un componente principal de las conchas de los crustáceos, como el cangrejo y el camarón (No et al., 2002). Además de ser biodegradable y no tóxico, presenta actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias patógenas de transmisión alimentaria (Ma et al., 2017; Sung et al., 2013). Varios países como Finlandia, Corea y Japón han autorizado el empleo de quitosano como aditivo alimentario, debido a las propiedades mencionadas anteriormente (Ma et al., 2017).

Aunque la mayoría de los AE son generalmente reconocidos como seguros, su uso como conservantes tiene limitaciones debido a las alteraciones

sensoriales que pueden ocasionar en el producto, ya que las dosis antimicrobianas efectivas pueden exceder los niveles organolépticamente aceptables (Ruiz-Navajas et al., 2013). Para evitar este problema, ocasionado principalmente por la adición directa del AE en los alimentos, éstos pueden ser incorporados en envases que interactúan con los alimentos para garantizar la inocuidad, conocidos como envases activos antimicrobianos (Emiroğlu et al., 2010). En los envases activos antimicrobianos el AE puede ser incorporado en películas que pueden reducir la difusión del compuesto antimicrobiano al alimento y prolongar la liberación del AE durante toda la vida útil del alimento (Ruiz-Navajas et al., 2013).

Muchos estudios demuestran que los agentes antimicrobianos cuando son incorporados en películas continúan siendo efectivos en el control de microorganismos patógenos (Muriel-Galet et al., 2012; Otero et al., 2014; Solano y Gante, 2012). Además, la creciente demanda de los consumidores por envases más naturales, desechables y reciclables, hace que las últimas investigaciones se centren en la incorporación de los compuestos antimicrobianos en materiales de envasado biodegradables (Atarés y Chiralt, 2016).

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano, y su carácter (bacteriostático/bactericida), del quitosano y de extractos (ricos en aceites esenciales) de tomillo, romero y ajo sobre cepas de *E. coli* (STEC y aEPEC) del hábitat lechero vacuno, que muestran una gran capacidad de multiplicación en condiciones de acidez y en presencia de sal, con el fin de establecer su potencialidad para el control de cepas patógenas de *E. coli* en quesos mediante su empleo en forma de películas biodegradables.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DE STEC Y aEPEC EN CONDICIONES DE ESTRÉS (pH y NaCl)

#### 2.1.1. Cepas empleadas y preparación del inóculo

Un total de 35 cepas de *E. coli* diarregénicas fueron utilizadas para las pruebas de resistencia a la acidez y a la sal. De éstas, 16 poseían alguno de los genes *stx* y por lo tanto son consideradas STEC. Las otras 19 cepas carecían de los genes para la producción de toxina Shiga y del gen *bfpA*, pero poseían el gen *eae*, siendo clasificadas como aEPEC. Todas estas cepas se habían aislado de muestras de leche y del ambiente de explotaciones de vacuno lechero (Capítulo I).

Las cepas de *E. coli* fueron recuperadas a partir de CryoInstant® donde se conservaban almacenadas a -30 °C, en TSB-YE e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Después del crecimiento en TSB-YE fueron sembradas en agar SMAC, para el aislamiento de colonias puras. Una colonia de cada cepa fue inoculada en tubos con 10 ml de TSB-YE que se incubaron a 37 °C durante 6 horas en agitación (150 rpm), después de lo cual una alícuota de 10 µl del cultivo de 6 horas fue transferida a 10 ml de TSB-YE, que fue incubado nuevamente, en las mismas condiciones descritas anteriormente, durante 18 horas, tras lo que fue empleado como inóculo en los ensayos de crecimiento.

#### 2.1.2. Condiciones de estrés (pH y NaCl)

Las cepas fueron desafiadas a condiciones de bajo pH y alta concentración de cloruro de sodio (NaCl), situación que normalmente está presente durante la elaboración del queso y que es considerada como factor de estrés para los microorganismos.

Para la realización de los ensayos de crecimiento (pruebas de desafío) se preparó medio TSB-YE en tres condiciones distintas: (I) con 2% de NaCl

(pH de  $7,2 \pm 0,1$ ), (II) con 0,45% de ácido láctico (pH de  $5,0 \pm 0,1$ ) y (III) con 2% de NaCl y 0,45% de ácido láctico (pH de  $5,0 \pm 0,1$ ). Las concentraciones de NaCl, de ácido láctico y los valores de pH se refieren al medio tras la inoculación bacteriana que se describe a continuación. Para cada condición estudiada, el medio fue distribuido en dos microplacas estériles, añadiéndose en cada pocillo 275  $\mu$ l.

### 2.1.3. Ensayo de crecimiento

A cada pocillo con 275  $\mu$ l de medio se le añadieron 75  $\mu$ l del cultivo de 18 horas de cada cepa (inóculo), alcanzándose una concentración final de aproximadamente  $10^7$  ufc/ml para cada cepa estudiada. Las microplacas fueron incubadas a 37 °C y la absorbancia ( $OD_{620}$ ) se midió en los tiempos 0, 4, 18 y 24 horas. Las lecturas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro Multiskan FC microplate (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EE.UU.). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado para cada cepa y condición. En todas las pruebas realizadas se utilizó un blanco de reacción sin microorganismos y un control positivo con TSB-YE inoculado con *E. coli*.

## 2.2.ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE QUITOSANO Y DE EXTRACTOS DE AJO, ROMERO Y TOMILLO FRENTE A CEPAS DE STEC Y aEPEC

### 2.2.1. Cepas

Para evaluar el efecto de diferentes compuestos antimicrobianos se eligieron las cepas STEC MK116C19 (O140:H32) y aEPEC MK127C9 (ONT:H2), ambas procedentes de muestras de leche de vaca y que habían mostrado las mayores capacidades de multiplicación en presencia de NaCl y de ácido láctico.

### 2.2.2. Preparación de los compuestos antimicrobianos

Las sustancias estudiadas fueron quitosano (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), extractos de ajo, romero y tomillo. Dichos extractos fueron adquiridos de Guinness Chemicals Ltd., Portlaoise (Irlanda) y su composición en aceites esenciales se presenta en la Tabla IV.1. Se eligió 100 mg/ml como concentración máxima para los extractos de especias, porque probablemente los niveles más altos serían inaceptables sensorialmente para la aplicación en los alimentos.

Se prepararon soluciones de trabajo a 100 mg/ml de los extractos de ajo, romero y tomillo en una solución estéril de dimetil sulfóxido (DMSO) 10% con Tween 80 al 0,5%. Partiendo de dicha solución, se realizaron diluciones seriadas en el mismo diluyente para obtener las concentraciones deseadas del estudio. Las diluciones de quitosano (0,25–1,0 mg/ml) se realizaron en solución de ácido acético glacial al 1%, ajustando su pH a 6 (con NaOH 10 N) y esterilizándolas a 121 °C durante 15 minutos. En la Tabla IV.2 se muestran las concentraciones probadas de cada compuesto antimicrobiano.

### 2.2.3. Ensayo de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos se determinó mediante la técnica de difusión en agar (Emiroğlu et al., 2010). A tal fin, discos de papel filtro con 5,5 mm de diámetro y con un grosor de 0,15 mm fueron impregnados con 10 µl de la solución a ensayar y depositados en placas de agar MH, en las que previamente se había realizado una extensión por toda la superficie con un hisopo que se había sumergido en una solución de  $10^6$  ufc/ml de la correspondiente cepa de *E. coli*. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y la actividad antibacteriana se cuantificó midiendo el halo de inhibición, alrededor de los discos, con un calibre digital. Todos los análisis se realizaron por triplicado para cada cepa y condición. Además, se incluyeron controles negativos, utilizando discos de papel sin añadir las sustancias antimicrobianas ensayadas.

**Tabla IV.1.** Composición en aceites esenciales de los extractos de tomillo (Thyme CO<sub>2</sub>-SE Extract), romero (Rosemary CO<sub>2</sub>-TO Extract) y ajo (Garlic CO<sub>2</sub>-TO Extract).

Componente	Contenido (%) (g/g)		
	Extracto de tomillo	Extracto de romero	Extracto de ajo
Alpha Pinene	0,26	10,70	-
Beta Myrcene	0,31	3,40	-
p-Cymene	11,70	-	-
Limonene	0,24	3,30	-
1,8 Cineole	0,57	31,80	-
Gamma Terpinene	4,10	-	-
Linalool	1,70	0,80	-
Borneol	0,72	3,60	-
Thymol	61,60	-	-
Carvacrol	4,00	-	-
Caryophyllene	2,70	-	-
Camphene	-	5,20	-
Camphor	-	23,10	-
Alpha Terpineol	-	2,60	-
Caryophyllene	-	3,30	-
Humulene	-	0,89	-
Verbenone	-	2,00	-
Bornyl Acetate	-	1,20	-
4-Terpinel	-	0,88	-
Allicin	-	-	0,01
Ajoen	-	-	0,01
2-vinyl-1,3-dithiin	-	-	0,06
2-vinyl-1,2-dithiin	-	-	0,01
Diallyldisulfid	-	-	0,35
Allylmenthyltrisulfid	-	-	0,29
Diallytrisulfid	-	-	2,30
<b>Total</b>	<b>87,90</b>	<b>92,77</b>	<b>3,03</b>

**Tabla IV.2.** Compuestos antimicrobianos ensayados y sus concentraciones.

Compuesto antimicrobiano	Concentraciones (mg/ml)			
Extracto de tomillo	1	10	50	100
Extracto de romero	1	10	50	100
Extracto de ajo	0,1	1	10	50
Quitosano	0,25	0,50	0,75	1

### 2.3.DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE TOMILLO CON ACTIVIDADES BACTERIOSTÁTICA Y BACTERICIDA FRENTE A CEPAS DE STEC Y aEPEC

Debido a los resultados obtenidos anteriormente con las cepas STEC MK116C19 (O140:H32) y aEPEC MK127C9 (ONT:H2), con diferentes compuestos antimicrobianos, se eligió el extracto de tomillo (TO) para dar continuidad a las pruebas de actividad antimicrobiana frente dichas cepas. La actividad antimicrobiana del extracto de TO fue estudiada *in vitro* por dos procedimientos: (I) en medio de cultivo líquido y (II) mediante biopelículas a las que se había incorporado extracto de TO.

#### 2.3.1. Actividad antimicrobiana en medio líquido

Las concentraciones de extracto TO que fueron objeto de investigación estaban en un rango de 0,1 a 1 mg/ml, en TSB-YE.

Para determinar la concentración mínima inhibidora (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de TO, se utilizó la técnica de dilución en caldo (Becerril et al., 2007) con modificaciones. En viales de 10 ml se depositaron 9,9 ml de TSB-YE al que se había añadido la cantidad pertinente de la solución de trabajo de extracto de tomillo de 100 mg/ml que permitiera alcanzar la concentración de extracto a ensayar. Se probó el efecto de las siguientes concentraciones de extracto de tomillo: 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 mg/ml.

Cada vial se inoculó con 100  $\mu$ l del cultivo de 18 horas en TSB-YE de la correspondiente cepa de *E. coli*, lográndose un nivel inicial de unos  $10^7$  ufc/ml.

Los viales se introdujeron en el equipo Bactrac™ 4000 (Sy-Lab; Gomensoro Instrumentación Científica, Madrid), donde se incubaron a 37 °C durante 24 horas, midiéndose la impedancia cada 15 minutos.

Trascurrido el tiempo del análisis (24 horas) en el Bactrac™, se tomaron 100  $\mu$ l de cada vial y se añadieron a 10 ml de caldo TSB-YE, que fue incubado

hasta 5 días a 37 °C, tras lo que se examinaron visualmente. La aparición de turbidez en el medio (TSB-YE) fue considerada como crecimiento, mientras que los tubos que permanecían transparentes y sin turbidez después de la incubación se consideraron indicativos del efecto bactericida de la correspondiente concentración de extracto de TO. Además, de cada vial que se había incubado 24 horas en el Bactrac™ se tomó 1 ml, que se diluyó en 9 ml de solución salina peptonada obteniendo una dilución 1:10, y a partir de ésta se realizaron las oportunas diluciones decimales, también con solución salina peptonada, de las que se sembró por profundidad en placas de *Tryptone Soya Agar* con 0,6% *Yeast Extract* (TSA-YE, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), que se incubaron a 37 °C durante 24 horas, tras lo que se realizó el correspondiente recuento de colonias.

En todas las pruebas realizadas se utilizó un blanco de reacción sin microorganismos y un control positivo con TSB-YE inoculado con *E. coli*. Cada solución fue testada por duplicado y el experimento se repitió en tres momentos diferentes (n=6) para cada cepa.

Se consideró como CMI de extracto de TO la más baja concentración en el medio TSB-YE+TO que no mostraba alteración significativa de la impedancia en los viales del Bactrac™ durante las 24 horas de incubación (es decir, que no mostraba crecimiento de la correspondiente cepa de *E. coli*) y al mismo tiempo mostraba crecimiento en los posteriores cultivos en TSB-YE (turbidez a los 5 días) y en TSA-YE (colonias a las 24 horas).

Se consideró como CMB de extracto de TO la más baja concentración en el medio TSB-YE+TO que no mostraba alteración significativa de la impedancia en los viales del Bactrac™ durante las 24 horas de incubación (es decir, que no mostraba crecimiento de la correspondiente cepa de *E. coli*) y al mismo tiempo no mostraba crecimiento en los posteriores cultivos en TSB-YE (transparencia y ausencia de turbidez a los 5 días) y en TSA-YE (ausencia de colonias a las 24 horas).

### 2.3.2. Actividad antimicrobiana de las biopelículas de TO

Para la preparación de las biopelículas de TO se utilizó aceite comercial Thyme CO<sub>2</sub>-SE Extract (Guinness Chemicals Ltd., Portlaoise, Irlanda), cuya composición se indica en la Tabla IV.1, disuelto en una proporción de 100 mg/ml en una solución acuosa estéril de DMSO 10% con Tween 80 al 0,5%. Se prepararon biopelículas compuestas de dicha solución de extracto TO, 3% (p/v) de gelatina y 1% (p/v) de agar-agar. Primeramente, la solución de gelatina y agar-agar fue disuelta en agua destilada y esterilizada a 115 °C durante 15 minutos. Tras enfriar en baño-maría a 40 °C fue añadida la solución de TO, alcanzando las concentraciones finales de 2, 1, 0,8 y 0% (p/v). A continuación, se depositaron 12 ml de dicho fluido en placas de Petri esperando unos minutos para que se produjera la solidificación, tras lo que fueron transferidas a una estufa a 18 °C con humedad controlada del 60%. Después de 20 horas en dichas condiciones las biopelículas estaban listas para su empleo y tenían un espesor final comprendido entre 0,15-0,18 mm (al ser medido con un calibre digital).

El efecto antimicrobiano de las biopelículas se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en agar, descrita anteriormente, utilizando trozos de las biopelículas de 9 x 9 mm en vez de discos de papel impregnados. Además, para determinar si las biopelículas de aceite esencial de TO eran bactericidas o bacteriostáticas, después de la medición de los halos de inhibición con calibre digital se tomaron muestras de agar (9 x 9 mm) que estaban en contacto con las películas y se depositaron en 10 ml de caldo TSB-YE, que fueron incubados hasta 5 días a 37 °C y se examinaron visualmente. La ausencia de turbidez tras dicha incubación (5 días, 37 °C) ponía de manifestó el carácter bactericida del efecto antimicrobiano mostrado en el procedimiento de difusión en agar (halos de inhibición). La combinación de halos de inhibición en las placas de agar y la presencia de turbidez en los tubos de TSB-YE a los 5 días de incubación a 37 °C se consideró indicativo de un efecto bacteriostático.

## 2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

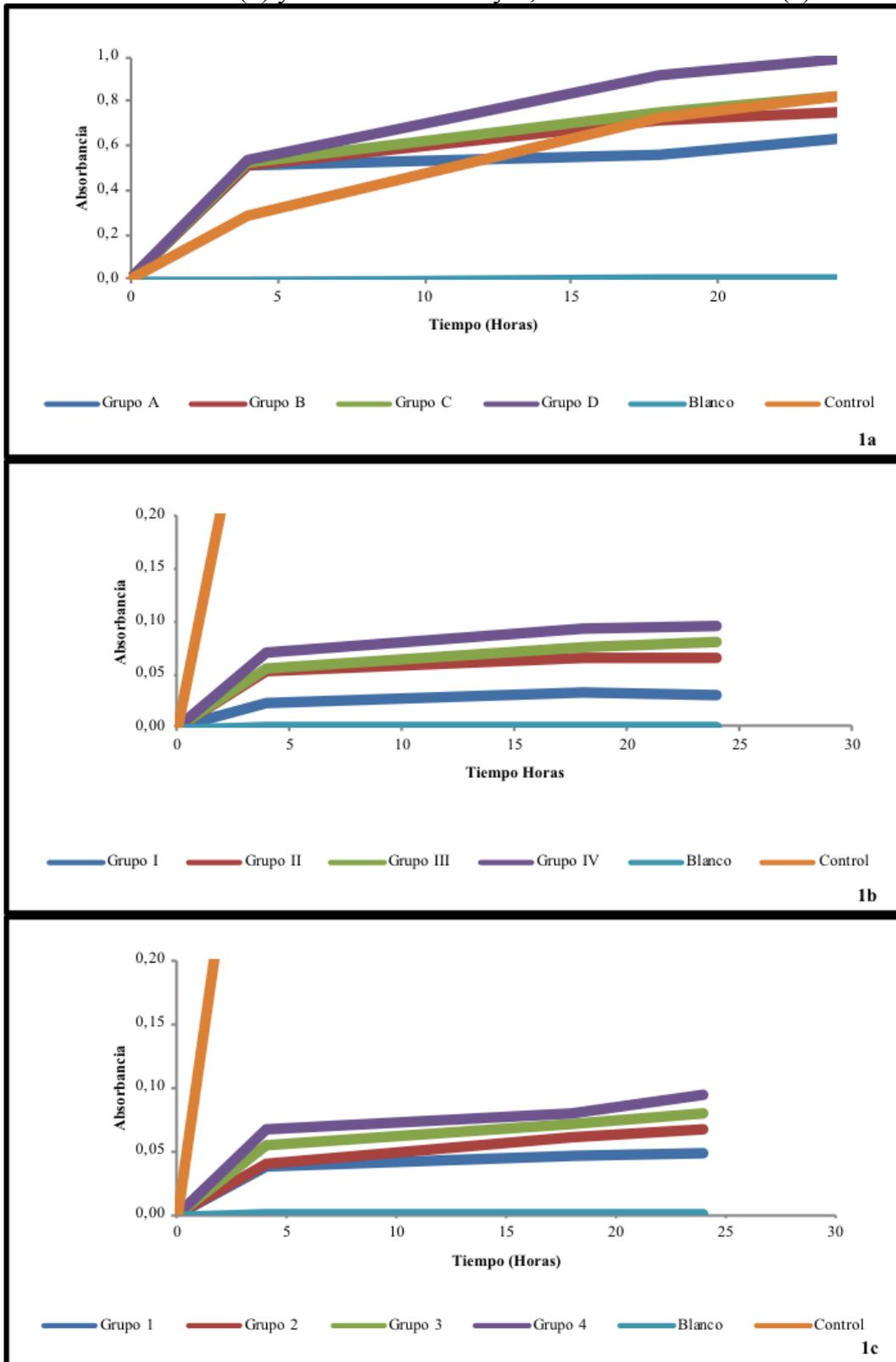
Los datos de los recuentos microbianos, transformados en  $\log_{10}$ , y las medidas de los halos de inhibición fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de diferentes concentraciones del aceite esencial de tomillo en las cepas de STEC y aEPEC. Las diferencias entre los efectos se evaluaron mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para cada concentración del aceite esencial de tomillo se compararon los recuentos y los halos de las cepas STEC y aEPEC mediante la prueba de la *t-Student* para diferencias entre medias y la prueba de Levene para la igualdad de las varianzas. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura IV.1 se muestra el comportamiento de 16 cepas de STEC y 19 de aEPEC en TSB-YE con 2% de NaCl (Figura IV.1a), con 0,45% de ácido láctico (Figura IV.1b) y con la combinación de ambas condiciones (Figura IV.1c). En cada una de las situaciones descritas anteriormente las 35 cepas fueron agrupadas por la semejanza de su resistencia, en cuatro grupos distintos, si bien en cada condición ensayada las bacterias presentaron un comportamiento distinto, por lo que los grupos están compuestos por distintas cepas bacterianas en cada ensayo. En la condición con 2% de NaCl los grupos fueron nombrados de A-D, con 0,45% de ácido láctico se identificaron como I-IV, mientras que combinando ambas condiciones los grupos se denominaron 1-4 (Figura IV.1).

La concentración de 2% de NaCl no demostró ser efectiva en el control de las cepas de STEC y aEPEC, aunque el grupo A (5 STEC y 4 aEPEC) mostró más dificultades que el resto para reproducirse en esta situación (Figura IV.1a). Por otro lado, la concentración de 0,45% de ácido láctico fue bastante efectiva en el control de las cepas de STEC y aEPEC (Figura IV.1b), efecto semejante fue observado cuando se añadió 2% de NaCl al TSB-YE con 0,45% de ácido láctico, pues en ambos casos los cambios en la OD<sub>620</sub> a lo largo del tiempo fueron escasos (Figura IV.1c). Con los resultados del comportamiento de las cepas estudiadas en las pruebas de NaCl y acidez fue posible elegir una cepa de STEC y otra de aEPEC, que demostraron mayor resistencia al 2% de NaCl en combinación con 0,45% de ácido láctico. Las dos cepas seleccionadas [MK116C19 (STEC O140:H32) y MK127C9 (aEPEC ONT:H2)] pertenecen al grupo IV del ensayo de acidez y al grupo 4 de la prueba de acidez y NaCl, siendo los grupos que mejor se multiplicaron en dichas condiciones (Figura IV.1).

**Figura IV.1.** Evolución de los valores de absorbancia a 620 nm de cepas de STEC y aEPEC cultivadas durante 24 horas en medio TSB-YE con 2% de NaCl (a), con 0,45% de ácido láctico (b) y con 2% de NaCl y 0,45% de ácido láctico (c).



Entre todos los compuestos con actividad antimicrobiana probados mediante la técnica de difusión en agar utilizando discos de papel, solamente el extracto de TO mostró actividad antimicrobiana frente a STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2. Resultados semejantes fueron observados por Smith-Palmer et al. (1998), que probaron 23 extractos oleosos de especias frente a una cepa de *E. coli* y hallaron que los aceites esenciales de romero y ajo no presentaron ninguna actividad antimicrobiana, mientras que el de TO estaba entre los que mayor actividad poseía.

El quitosano, aunque tenga efecto antibacteriano comprobado (Ma et al., 2017), no mostró ningún efecto frente las cepas STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2. La ausencia de efecto antimicrobiano del quitosano puede estar relacionada con el hecho de que el quitosano no se difunda a través del agar, de manera que sólo se inhiben los organismos en contacto directo con los discos (Ruiz-Navajas et al., 2013).

En la Tabla IV.3 se muestran las medidas (mm) de los halos de inhibición del extracto de aceites esenciales de TO frente a las cepas de STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2. El extracto de TO mostró actividad antimicrobiana frente a ambas cepas a partir de concentraciones de 10 mg/ml, alcanzando una mayor actividad de inhibición con 100 mg/ml (Tabla IV.2). Los resultados de nuestro estudio están de acuerdo con otros trabajos que demostraron que las propiedades antimicrobianas del TO son dosis-dependientes (Burt, 2004; Sagdıç et al., 2002).

**Tabla IV.3.** Actividad antimicrobiana de extracto de aceites esenciales de tomillo frente a STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 determinada mediante la técnica de difusión en agar Mueller Hinton y expresada mediante el tamaño (en mm) de los halos de inhibición.

Concentración del extracto de tomillo (mg/ml)	STEC	aEPEC
1	5,5 <sup>aA</sup>	5,5 <sup>aA</sup>
10	<sup>2</sup> 6,38±0,30 <sup>ba1</sup>	6,37±0,10 <sup>ba</sup>
50	7,52±0,65 <sup>ba</sup>	7,87±0,65 <sup>ca</sup>
100	10,91±0,69 <sup>ca</sup>	9,51±0,42 <sup>da</sup>

<sup>1</sup>Para una misma columna, superíndices con diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores. Mientras que en las filas superíndices con idénticas letras mayúsculas no muestran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las poblaciones de aEPEC y STEC.

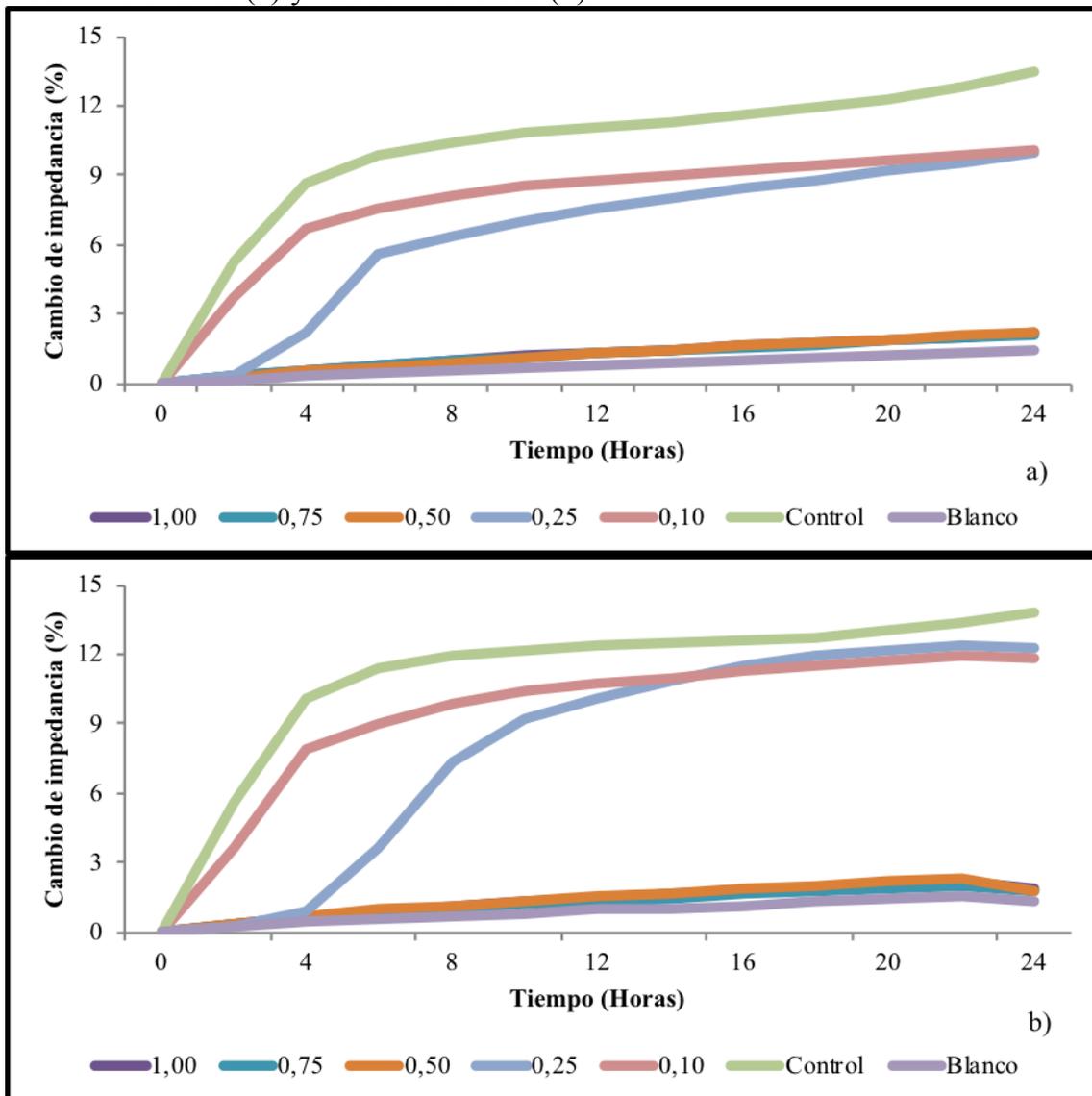
<sup>2</sup>Los valores son el promedio de tres análisis y sus desviaciones estándares. El diámetro de la zona de inhibición (mm) incluye el disco de papel (5,5 mm).

La técnica de difusión en agar fue utilizada para seleccionar un compuesto que presentase una mayor actividad antimicrobiana frente las cepas de STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2. Después de la selección del extracto de aceites esenciales de TO, la técnica de dilución en caldo fue utilizada para determinar la CMI y la CMB. En la Figura IV.2 se muestra el efecto de diferentes concentraciones del extracto de aceites esenciales de TO en el crecimiento de las cepas STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 estimado mediante la variación en la impedancia del medio de cultivo a lo largo de 24 horas, mientras que en la Tabla IV.4 se observa el comportamiento de los supervivientes a las 24 horas de dicho cultivo, el cual permite establecer el efecto antimicrobiano observado: bacteriostático o bactericida.

No hubo diferencias significativas ni en la CMI y ni en la CMB del extracto de TO entre las cepas STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 ( $p>0,05$ ). La CMI fue de 0,50 mg/ml (Figura IV.2 y Tabla IV.4), resultado similar al hallado por Burt y Reinders (2003), que encontraron valores para CMI de 0,63 mg/ml utilizando extracto de aceite esencial de TO frente a una cepa de *E.coli* O157:H7.

La CMB del extracto de TO fue de 0,75 mg/ml para ambas cepas de *E. coli* (STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2) (Figura IV.2 y Tabla IV.4). Otros estudios encontraron valores superiores para la CMB del extracto de TO frente a cepas de *E. coli*, en un rango de 1-1,3 mg/ml (Burt y Reinders, 2003; Cutillas et al., 2017; Santurio et al., 2014), si bien también se han publicado valores inferiores a 0,35 mg/ml (Boskovic et al., 2015; Xue et al., 2015). La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está directamente correlacionada con la presencia de sus componentes bioactivos volátiles (Oliveira et al., 2015); en el caso del aceite esencial de TO los principales componentes con actividad antimicrobiana son timol, p-cimeno,  $\alpha$ -terpinoleno y carvacrol (Assiri et al., 2016; Burt, 2004). La composición de dichos componentes en un extracto pueden verse afectada por muchos factores, como la edad de la planta, el origen geográfico y el método empleado para la extracción de los aceites esenciales (Calo et al., 2015; Ribeiro-Santos et al., 2017). Estos factores pueden ser los responsables de las diferencias encontradas en los diferentes estudios en relación con la CMI y la CMB del extracto de aceites esenciales de TO.

**Figura IV.2.** Cambio en la impedancia del medio TSB-YE con diferentes concentraciones de extracto de tomillo (0,1-1 mg/ml) durante el crecimiento de STEC O140:H32 (a) y aEPEC ONT:H2 (b) a 37 °C.



**Tabla IV.4.** Poblaciones de las cepas STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 que se mantenían después de 24 horas de cultivo a 37 °C en TSB-YE con diferentes concentraciones de extracto de tomillo y capacidad de multiplicación de dichas poblaciones.

Concentración de extracto de tomillo (mg/ml)	STEC		aEPEC	
	Población a las 24 horas (ufc/ml)	Multiplicación de las supervivientes <sup>2</sup>	Población a las 24 horas	Multiplicación de las supervivientes
0	9,24±0,08 <sup>aA1</sup>	+	9,19±0,10 <sup>aA</sup>	+
0,1	9,20±0,08 <sup>aA</sup>	+	9,19±0,12 <sup>aA</sup>	+
0,25	8,25±0,41 <sup>aA</sup>	+	8,04±0,56 <sup>bA</sup>	+
0,50	2,97±2,17 <sup>bA</sup>	+	2,98±0,96 <sup>cA</sup>	+
0,75	<0,5	-	<0,5	-
1,00	<0,5	-	<0,5	-

<sup>1</sup>Para una misma columna, superíndices con diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los recuentos. Mientras que en las filas superíndices con idénticas letras mayúsculas no muestran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los recuentos de aEPEC y STEC. Los valores son el promedio de seis ensayos y sus desviaciones estándares.

<sup>2</sup>El símbolo + representa crecimiento tras inoculación en el medio TSB-YE e incubación a 37 °C durante cinco días y el símbolo - la ausencia de crecimiento en esas condiciones.

En Tabla IV.5 se muestran los efectos de las biopelículas con extracto de TO frente a STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2.

Como se muestra en dicha Tabla IV.5, las biopelículas con 20 mg/ml de extracto de TO mostraron efecto bactericida frente a las dos cepas de *E. coli*, las que contenían 10 mg/ml de extracto de TO se mostraron bacteriostáticas, mientras que las biopelículas con concentraciones de TO inferiores a 10 mg/ml no inhibieron a ninguna de las dos cepas. Dichos resultados fueron muy similares a los encontrados en la prueba de difusión en agar con discos impregnados con extracto de TO donde se había detectado efecto antimicrobiano a partir de la concentración de 10 mg/ml para ambas cepas (Tabla IV.3). Emiroğlu et al. (2010) incorporaron extracto de aceites esenciales de TO en biopelículas de proteína de soja, mientras que Solano y de Gante (2012) incorporaron dicho extracto por extrusión en películas de polietileno de baja densidad y ambos también observaron efectos antibacterianos frente a cepas de *E. coli* O157:H7 a partir de concentraciones de 10 mg/ml.

**Tabla IV.5.** Actividad bactericida o bacteriostática de biopelículas con extracto de tomillo frente a STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 determinada mediante difusión en agar Mueller Hinton.

<b>Concentración de extracto de tomillo en la biopelícula (mg/ml)</b>	<b>STEC</b>		<b>aEPEC</b>	
	Diámetro del halo de inhibición (mm) <sup>1</sup>	Carácter de la inhibición <sup>2</sup>	Diámetro del halo de inhibición (mm)	Carácter de la inhibición
0	9 <sup>aA3</sup>	NI <sup>4</sup>	9 <sup>aA</sup>	NI
8	9 <sup>aA</sup>	NI	9 <sup>aA</sup>	NI
10	9,77±0,09 <sup>bA</sup>	Bacteriostático <sup>5</sup>	9,75±0,14 <sup>bA2</sup>	Bacteriostático
20	12,53±0,67 <sup>cA</sup>	Bactericida <sup>6</sup>	12,99±0,27 <sup>cA</sup>	Bactericida

<sup>1</sup>El diámetro de la zona de inhibición incluye el del disco de la biopelícula (9 mm).

<sup>2</sup>Evaluated en función del crecimiento o no en TSB-YE (37 °C/ 5 días) inoculado con el trozo de agar donde se había ubicado la biopelícula el ensayo de difusión en agar.

<sup>3</sup>Para una misma columna, superíndices con diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores. Mientras que en las filas superíndices con idénticas letras mayúsculas no muestran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los recuentos de aEPEC y STEC. Los valores son el promedio de tres análisis y sus desviaciones estándares.

<sup>4</sup>NI, no inhibición (crecimiento posterior en TSB-YE).

<sup>5</sup>Bacteriostático, inhibición en agar y crecimiento posterior en TSB-YE.

<sup>6</sup>Bactericida, inhibición en agar y sin crecimiento posterior en TSB-YE.

#### **4. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES**

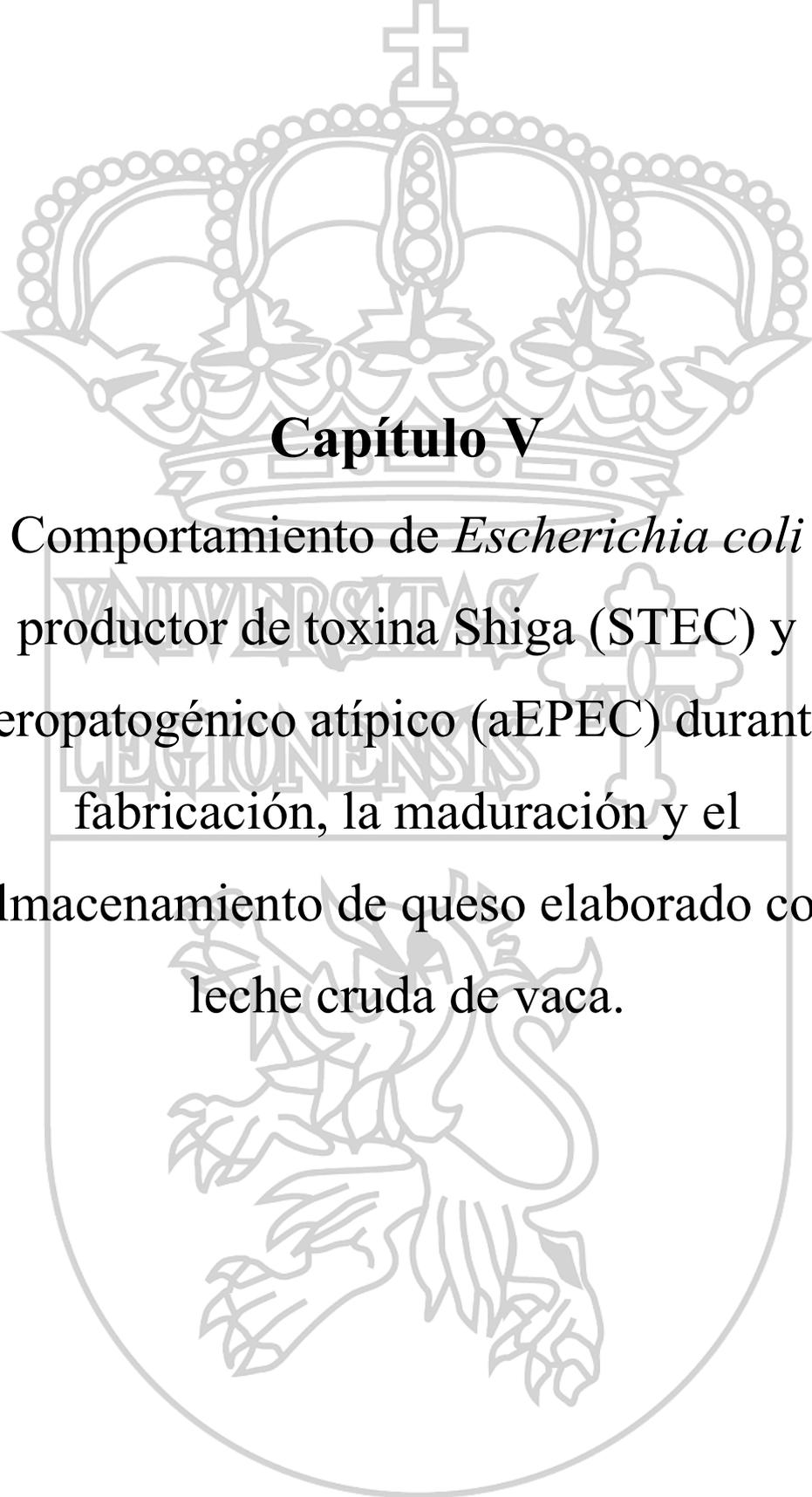
Entre los compuestos antimicrobianos evaluados, el extracto de aceite esencial de tomillo mostró actividad antimicrobiana frente a dos cepas de *E. coli* diarreagénicas. Las bajas concentraciones bacteriostáticas y bactericidas de las biopelículas de aceite esencial de tomillo *in vitro* ponen de manifiesto su potencial interés para su empleo en sistemas de conservación alternativos al uso de conservantes químicos en la industria alimentaria.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Assiri, A.M.A., Elbanna, K., Abulreesh, H.H., Ramadan, M.F., 2016. Bioactive compounds of cold-pressed thyme (*Thymus vulgaris*) oil with antioxidant and antimicrobial properties. *J. Oleo Sci.* 65, 629–640. doi:10.5650/jos.ess16042
- Atarés, L., Chiralt, A., 2016. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 48, 51–62. doi:10.1016/j.tifs.2015.12.001
- Bae, Y.-M., Lee, S.-Y., 2017. Effect of salt addition on acid resistance response of *Escherichia coli* O157:H7 against acetic acid. *Food Microbiol.* 65, 74–82. doi:10.1016/j.fm.2016.12.021
- Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goñi, P., López, P., Nerín, C., 2007. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 1003–1011. doi:10.1007/s00216-007-1332-x
- Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M., Baltic, M.Z., 2015. Antimicrobial activity of thyme (*Thymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Sci.* 5, 18–21. doi:10.1016/j.profoo.2015.09.005
- Burgess, C.M., Gianotti, A., Gruzdev, N., Holah, J., Knöchel, S., Lehner, A., Margas, E., Esser, S.S., Sela Saldinger, S., Tresse, O., 2016. The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 221, 37–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.014
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Burt, S.A., Reinders, R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 162–167. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control* 54, 111–119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040
- Cutillas, A.-B., Carrasco, A., Martínez-Gutiérrez, R., Tomás, V., Tudela, J., 2017. Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC–MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities. *J. Food Drug Anal.* 0, 1–16. doi:10.1016/j.jfda.2017.05.004
- Emiroğlu, Z.K., Yemiş, G.P., Coşkun, B.K., Candoğan, K., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci.* 86, 283–288. doi:10.1016/j.meatsci.2010.04.016

- 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., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., Cerf, O., 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 190–212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008
- Ma, Z., Garrido-Maestu, A., Jeong, K.C., 2017. Application, mode of action, and *in vivo* activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydr. Polym.* 176, 257–265. doi:10.1016/j.carbpol.2017.08.082
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., 2012. Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 239–244. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.009
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6, 1451–1474. doi:10.3390/ph6121451
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P., 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 65–72. doi:10.1016/S0168-1605(01)00717-6
- Oliveira, T.L.C. de, Ramos, A.L.S., Ramos, E.M., Piccoli, R.H., Cristianini, M., 2015. Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.* 45, 60–85. doi:10.1016/j.tifs.2015.05.007
- 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. doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.022
- Pandey, A.K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N.N., Bajpai, V.K., 2017. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Front. Microbiol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.02161
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control* 47, 381–391. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.023
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N.R. de, Sanches-Silva, A., 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* 61, 132–140. doi:10.1016/j.tifs.2016.11.021
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J., 2013. *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control* 30, 386–392. doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.052

- Sagdıç, O., Kusçu, A., Özcan, M., Özçelik, S., 2002. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 19, 473–480. doi:10.1006/yfmic.494
- Santurio, D.F., De Jesus, F.P.K., Zanette, R.A., Schlemmer, K.B., Fraton, A., Fries, L.L.M., 2014. Antimicrobial activity of the essential oil of thyme and of thymol against *Escherichia coli* strains. *Acta Sci. Vet.* 42, 3–6.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 118–122. doi:10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x
- Solano, A.C.V., Gante, C. de R., 2012. Two different processes to obtain antimicrobial packaging containing natural oils. *Food Bioprocess Technol.* 5, 2522–2528. doi:10.1007/s11947-011-0626-3
- Sung, S.-Y., Sin, L.T., Tee, T.-T., Bee, S.-T., Rahmat, A.R., Rahman, W.A.W.A., Tan, A.-C., Vikhraman, M., 2013. Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 110–123. doi:10.1016/j.tifs.2013.08.001
- Villa, T.G., Veiga-Crespo, P., 2014. *Antimicrobial Compounds*. Springer, Berlin. doi:10.1007/978-3-642-40444-3
- Xue, J., Michael Davidson, P., Zhong, Q., 2015. Antimicrobial activity of thyme oil co-nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. *Int. J. Food Microbiol.* 210, 1–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.003



## Capítulo V

Comportamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) y enteropatógeno atípico (aEPEC) durante la fabricación, la maduración y el almacenamiento de queso elaborado con leche cruda de vaca.



## 1. INTRODUCCIÓN

STEC es una de las causas más común de enfermedades transmitidas por alimentos. En el año de 2015 fueron confirmados 5.901 casos de infecciones por STEC en la UE (EFSA, 2016). De estos, el 58,3% fueron causados por STEC no-O157. En los mismos años, los EE.UU. reportaron un total de 1.272 casos de infecciones por STEC, de los cuales 63,4% fueron causados por STEC no-O157 (CDC, 2017).

EPEC es otro patotipo de *E. coli* diarreagénicos transmitidos por alimentos, siendo uno de los mayores responsables de muertes de niños con diarrea en todo el mundo (Pearson et al., 2016). Dichas bacterias se dividen en dos subgrupos, tEPEC y aEPEC, basado en la presencia del plásmido pEAF presentes en tEPEC y ausentes en aEPEC (Vieira et al., 2016). Los humanos son el reservorio de las tEPEC, mientras que las aEPEC pueden tener como reservorio los humanos y los animales, principalmente aquellos utilizados para la producción de alimentos (Hernandes et al., 2009). Se considera que aEPEC es un patógeno emergente y que es más frecuente que el tEPEC en países desarrollados y en vías de desarrollo (Xu et al., 2016).

STEC y aEPEC han sido aisladas de animales utilizados para la producción de alimentos, principalmente en el ganado bovino (Kolenda et al., 2015; Smith et al., 2015; Torres, 2016). Diversas investigaciones han demostrado que la leche puede contaminarse por microorganismos patogénicos durante la obtención o en la transformación de la leche, si no se siguen las normas de higiene (Little et al., 2008). Por lo que se han aislado frecuentemente cepas de STEC y aEPEC en leche y productos lácteos (Álvarez-Suárez et al., 2016; Beraldo et al., 2014; Madic et al., 2011; Marozzi et al., 2016; Najand y Ghanbarpour, 2006; Ombarak et al., 2016; Zweifel et al., 2010). Como consecuencia de la presencia de dichas bacterias en la leche y de la elaboración de quesos con leche cruda para determinar el riesgo asociado a la ingesta de dichos productos es preciso evaluar la evolución de las referidas bacterias durante los procesos de elaboración y maduración de los quesos.

Hasta la fecha, la mayoría de los autores han centrado sus trabajos en el comportamiento de STEC, principalmente *E. coli* O157:H7, durante la fabricación del queso (Alemdar, 2016; D'Amico et al., 2010; Lekkas et al., 2006; Miszczycha et al., 2013; Peng et al., 2013; Spano et al., 2003), pero poco se sabe sobre el comportamiento de aEPEC durante la fabricación y maduración del queso.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar el comportamiento de dos cepas potencialmente patógenas de *E. coli* procedentes del hábitat lechero vacuno (una STEC no-O157 y otra aEPEC) durante los procesos de elaboración y maduración de queso elaborado a partir de leche cruda de vaca como paso previo al diseño de procedimientos para su control en este producto.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. CEPAS

Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron O140:H32 productora de toxina Shiga (STEC MK116C19) y ONT:H2 enteropatogénica atípica (aEPEC MK127C9), ambas procedentes de muestras de leche de vaca (tal y como se señala en los Capítulos II y III). Fueron elegidas teniendo en cuenta su mejor comportamiento frente a diferentes situaciones de estrés (pH y NaCl, Capítulo IV). Las cepas de *E. coli* fueron recuperadas a partir de CryoInstant® almacenados a -30 °C, en TSB-YE e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Para la preparación del inóculo las cepas de *E. coli* fueron sembradas en agar SMAC, y las colonias puras fueron aisladas de las placas y resembradas en 30 ml de TSB-YE e incubadas a 37 °C durante 6 horas en agitación (150 rpm), tras lo cual una alícuota de 30 µl del inóculo (6 horas) fue transferida a 30 ml de TSB-YE que fue incubado nuevamente en las mismas condiciones descritas anteriormente durante 18 horas. Para preparar los inóculos, se mezclaron volúmenes iguales de los cultivos de ambas cepas para obtener una concentración final de aproximadamente 10<sup>9</sup> ufc/ml, y se realizaron diluciones seriadas en solución salina peptonada para la obtención de una concentración final de 10<sup>5</sup> ufc/ml de cada cepa.

El cultivo iniciador utilizado en la fabricación del queso estaba compuesto por cepas liofilizadas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y *Streptococcus thermophilus* (CHOOZITM MA 4001 LYO 5 DCU, Danisco, Sassenage, Francia). Su preparación inicial se llevó a cabo en el día anterior a la elaboración de los quesos, disolviendo un sobre del fermento en 1 litro de leche desnatada estéril, seguido de una incubación de 24 horas a 37 °C.

## 2.2.PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO

La producción del queso fue dividida en dos condiciones: (I) queso elaborado a partir de leche cruda de vaca e inoculado con aEPEC (MK127C9) y STEC (MK116C19), y (II) queso con las mismas características que el anterior pero elaborado a partir de leche en la que no se inocularon las cepas de *E. coli*.

Para la fabricación de cada queso, se utilizaron 10 litros de leche cruda de vaca, ordeñada en el día, que fueron obtenidos de una granja perteneciente a la cooperativa Vega-Esla (León, España). Antes de empezar el proceso de elaboración del queso, se realizó la investigación de los genes *stx* y *eae* en las muestras de leche. El proceso de elaboración fue el mismo para ambas condiciones, salvo que la leche de la condición I se contaminó intencionalmente con el inóculo de cepas de *E. coli* para obtener una concentración final de  $10^3$  ufc/ml de cada cepa estudiada. La elaboración de los quesos se describe a continuación:

- Primeramente, la leche fue filtrada con una gasa estéril y vertida en una olla, donde fue calentada hasta 30 °C con agitación continua.
- Posteriormente se añadió 1,25 ml de cloruro de calcio (Laboratorios Arroyo, Santander, España) para los 10 litros de leche.
- Enseguida la temperatura fue aumentada a 37 °C y se añadió el cultivo iniciador, en una concentración de 1%. Para los quesos inoculados con las cepas de *E. coli* se añadieron 100 ml del inóculo. El inóculo se compuso por una mezcla de las cepas aEPEC y STEC ( $10^5$  ufc/ml), alcanzando una concentración final de  $10^3$  ufc/ml. Posteriormente la leche fue mantenida en una estufa a 37 °C hasta que su pH descendió 0,1 unidades (unos 40 minutos).
- El cuajo (Laboratorios Arroyo, Santander, España; 1:10.000) fue añadido en una proporción de 3 ml de cuajo para 10 litros de leche, diluido en 50 ml de agua estéril para facilitar su distribución. La leche fue agitada durante un minuto, luego se volvió poner en una estufa a 37 °C durante 40 minutos, hasta la formación óptima de la cuajada.

- Para el desuerado de la cuajada, ésta fue cortada y homogeneizada hasta que los trozos tenían el tamaño de un grano de arroz, simultáneamente se aumentó la temperatura a 38 °C para facilitar el desuerado.
- Finalizado el proceso de desuerado, la cuajada fue colocada en moldes para quesos de 900 g, donde se realizaron dos prensados. El primero con 0,01 kg/cm<sup>2</sup> durante una hora. Posteriormente fue realizado el volteado del queso y un segundo prensado de 0,03 kg/cm<sup>2</sup> durante 5 horas.
- Transcurridas las 6 horas de prensado, los quesos fueron puestos en una salmuera a 20% de NaCl y con el pH ajustado con ácido láctico a un valor similar al de los quesos. Fueron mantenidos en salmuera durante 6 horas a temperatura de refrigeración (7±1 °C). Terminado el salado, los quesos se dejaron a temperatura ambiente (20-24 °C) para escurrir durante 24 horas.
- La maduración fue realizada en una cámara a 10-12 °C, con una humedad de 85-90% durante tres meses. Durante la maduración se voltearon los quesos regularmente para conseguir una distribución homogénea de la sal.

### 2.3.TOMA DE MUESTRAS

Se tomaron muestras en los siguientes momentos del proceso de fabricación y maduración del queso:

- En la leche cruda, tras ser inoculada (lote I) y tras la incubación (lotes I y II).
- De la cuajada, al final del prensado y cuando terminó el escurrido de los quesos.
- Tras el inicio de maduración, la toma de muestras fue en los días 7, 15, 30, 45, 60 y 90.

Cada condición del estudio estaba compuesta por dos quesos y de cada queso se tomaron tres muestras en cada momento, es decir, en total se realizaron seis análisis para cada momento en las distintas condiciones.

A partir del momento en que se formó el queso, las tomas de muestras fueron realizadas con un sacabocados y el hueco fue rellenado con parafina estéril fundida (Acofarma, Barcelona, España) para mantener las condiciones del interior de los quesos.

## 2.4. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

La medición de pH se realizó con un pHmetro de punción Testo 205 (Instrumentos Testo, Lenzkirch, Alemania). La actividad de agua ( $a_w$ ) fue determinada en el equipo AquaLab modelo CX-2 (Decagon, Pullman, WA, EE.UU.) como determina el fabricante.

Para la determinación del contenido de NaCl se utilizó el método oficial de determinación de cloruros en queso descrito por Volhard según la Norma AOAC 935.43 (Kosikowski, 1978). El proceso consistió en lo siguiente:

- En un matraz de 250 ml se pesaron 3 g de queso, añadiendo a continuación 25 ml de nitrato de plata 0,1 N (Panreac Química, Barcelona, España), 10 ml de ácido nítrico al 60% (Panreac Química, Barcelona, España) y 50 ml de agua destilada.
- La mezcla fue agitada y llevada a ebullición, añadiendo a continuación 15 ml de una solución de permanganato potásico 5% en porciones de 5 ml.
- Se retiró el matraz del fuego y después de enfriar fue filtrado a un matraz volumétrico de 200 ml y el papel lavado con agua destilada hasta completar el volumen.
- A continuación, se añadieron 2 ml de una solución saturada de sulfato férrico-amónico (Panreac Química, Barcelona, España) y finalmente se valoró el exceso de nitrato de plata con una solución de tiocianato de potásico 0,1 N (Panreac Química, Barcelona, España) hasta la aparición de un color pardo-rojizo persistente durante 30 segundos.

Se efectuó el ensayo de un blanco incorporando 3 g de azúcar y siguiendo el proceso descrito. La fórmula para calcular el porcentaje de cloruro de sodio

fue:  $(0,0058 \times (V_0 - V) / P) \times 100$ , donde  $V_0$  es el volumen de tiocianato de potásico 0,1 N gastado en la valoración del blanco,  $V$  es el volumen de tiocianato de potásico 0,1 N empleado en la valoración de la muestra, y  $P$  es el peso, en gramos, de la muestra.

## 2.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Tras la toma de muestras en los momentos iniciales (desde la leche hasta el escurrido posterior al salado de los quesos), una fracción de 10 ml o 10 g se colocó en una bolsa de homogenización estéril a la que se añadieron 90 ml de solución salina al 0,85% con peptona al 0,1%, obteniendo una dilución de 1:10. Esta mezcla fue homogeneizada en un homogeneizador BagMixer-400 (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, Francia) durante 180 segundos y a partir del homogeneizado se realizaron las oportunas diluciones decimales con solución salina peptonada. Tras los 7 días de maduración del queso, donde se esperaba un descenso en la población de *E. coli*, las muestras de 10 g de queso fueron homogeneizadas con 40 ml de TSB-YE, obteniendo una dilución de 1:5 y ampliando el límite de detección hasta 2,5 ufc/g.

### 2.5.1. *Escherichia coli*

El recuento de *E. coli* fue realizado en el medio *Tryptone Bile X-glucuronide* (TBX, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para lo que 1 ml de las diluciones del homogenizado era distribuido en la profundidad del medio. Las placas de TBX se incubaron a 37 °C durante 24 horas y posteriormente se realizó el recuento de colonias blancas de 1,5-2 mm de diámetro como correspondientes a la cepa de aEPEC MK127C9 (beta-glucoronidasa negativa), y de colonias azules de 1,5-2 mm de diámetro como pertenecientes a la cepa de STEC MK116C19 (beta-glucoronidasa positiva). Aleatoriamente las colonias eran confirmadas por PCR para presencia de los genes *stx* y *eae* en el homogeneizado.

En las muestras de queso tomadas a partir de 7 días de maduración, el homogeneizado TSB-YE, además de ser empleado para la siembra directa en TBX, se incubó a 42 °C durante 18 horas para, en el supuesto de que no se

detectara ninguna colonia en las placas de cultivo (TBX), poder determinar mediante la técnica de PCR la presencia de los genes *stx* y *eae*.

### 2.5.2. Confirmación por PCR de los tipos de las colonias de *E. coli* diarreagénicas mediante los genes *stx* y *eae*

El análisis por PCR se llevó a cabo como se describe en el Material y Métodos del capítulo I.

### 2.5.3. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Para el recuento de las bacterias ácido-lácticas se sembraron 1 ml de las diluciones del homogenizado en la profundidad de placas de agar *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y al final se añadió una sobrecapa del mismo medio. Posteriormente se incubaron las placas a 30 °C durante 48 horas.

## 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de los recuentos microbianos fueron transformados en  $\log_{10}$ , y tanto éstos como los datos físico-químicos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de la etapa de procesado. Las diferencias entre los efectos se evaluaron mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para cada etapa del procesado se comparó la evolución de las poblaciones de aEPEC y STEC mediante la prueba de la *t-Student* para diferencias entre medias y la prueba de Levene para comprobar la igualdad de varianzas. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los quesos elaborados pesaban cerca de 900 g y los resultados de los análisis físico-químicos durante la elaboración y maduración de los quesos inoculados con las cepas de *E. coli* (STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2) y de los quesos control sin inóculo de *E. coli* se muestran en la Tabla V.1.

Los valores de pH y  $a_w$  fueron disminuyendo a lo largo del proceso, mientras que la concentración de sal fue aumentando en todos los quesos analizados (Tabla V.1). Al final de la maduración, las características físico-químicas de los quesos inoculados con las cepas de *E. coli* (pH: 5,11;  $a_w$ : 0,87 y NaCl: 2,98) eran similares a las de los quesos control sin inóculo de *E. coli* (pH: 5,10;  $a_w$ : 0,88 y NaCl: 3,25; Tabla V.1).

En la Tabla V.2 se muestra la evolución de la población de bacterias (*E. coli*, aEPEC, STEC y bacterias ácido lácticas) durante los procesos de elaboración y maduración de quesos elaborados con leche cruda de vaca.

La leche utilizada para la fabricación de los quesos fue negativa para los genes *stx* y *eae* y presentaba un recuento medio de *E. coli* (en TBX) inferior a 0,80 log ufc/ml (Tabla V.2).

Para la fabricación del queso inoculado con las cepas de *E. coli*, la leche tras la inoculación con éstas presentó recuentos iniciales de 3,14 log ufc/ml para STEC O140:H32 y 3,49 log ufc/ml para aEPEC ONT:H2 sin diferencia significativa entre los recuentos de ambas cepas ( $p > 0,05$ , Tabla V.2). Las cepas siguieron evolucionando sin diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) hasta el momento de la cuajada (Tabla V.2).

**Tabla V.1.** Evolución de los parámetros físico-químicos (pH,  $a_w$  y sal) durante el proceso de elaboración y maduración de queso elaborado con leche cruda de vaca.

Fase de Producción	Queso control <sup>1</sup>			Queso inoculado <sup>2</sup>		
	pH	$a_w$	NaCl	pH	$a_w$	NaCl
Leche	6,76 ±0,01 <sup>a</sup>	1,00 ±0,001 <sup>a</sup>	-	6,70 ±0,03 <sup>a4</sup>	1,00 ±0,002 <sup>a</sup>	-
Tras inoculación <sup>3</sup>	-	-	-	6,69 ±0,03 <sup>a</sup>	1,00 ±0,002 <sup>a</sup>	-
Tras incubación	6,44 ±0,03 <sup>b</sup>	1,00 ±0,002 <sup>a</sup>	-	6,44 ±0,04 <sup>b</sup>	0,99 ±0,001 <sup>a</sup>	-
Cuajada recién cortada	5,67 ±0,06 <sup>c</sup>	0,99 ±0,002 <sup>ab</sup>	-	5,83 ±0,07 <sup>c</sup>	0,99 ±0,001 <sup>a</sup>	-
Tras prensado	5,00 ±0,09 <sup>d</sup>	0,99 ±0,001 <sup>ab</sup>	-	4,86 ±0,03 <sup>f</sup>	0,99 ±0,001 <sup>a</sup>	-
Tras salado y escurrido	5,19 ±0,02 <sup>g</sup>	0,97 ±0,010 <sup>bc</sup>	1,90 ±0,42 <sup>a</sup>	4,99 ±0,14 <sup>e</sup>	0,96 ±0,011 <sup>b</sup>	2,60 ±0,63 <sup>abc</sup>
Día 7 de maduración	5,08 ±0,02 <sup>def</sup>	0,96 ±0,009 <sup>c</sup>	2,45 ±0,66 <sup>ab</sup>	5,05 ±0,04 <sup>de</sup>	0,96 ±0,004 <sup>b</sup>	2,02 ±0,36 <sup>a</sup>
Día 15 de maduración	5,13 ±0,04 <sup>fg</sup>	0,95 ±0,009 <sup>cd</sup>	2,66 ±0,60 <sup>abc</sup>	5,10 ±0,01 <sup>d</sup>	0,96 ±0,006 <sup>b</sup>	2,14 ±0,42 <sup>ab</sup>
Día 30 de maduración	5,04 ±0,04 <sup>def</sup>	0,93 ±0,018 <sup>de</sup>	2,96 ±0,56 <sup>bc</sup>	5,15 ±0,04 <sup>d</sup>	0,92 ±0,012 <sup>c</sup>	2,86 ±0,46 <sup>c</sup>
Día 45 de maduración	5,02 ±0,05 <sup>de</sup>	0,92 ±0,010 <sup>e</sup>	3,26 ±0,19 <sup>c</sup>	5,08 ±0,03 <sup>de</sup>	0,92 ±0,009 <sup>cd</sup>	2,70 ±0,30 <sup>b</sup> <sup>c</sup>
Día 60 de maduración	5,12 ±0,07 <sup>efg</sup>	0,91 ±0,025 <sup>e</sup>	3,02 ±0,70 <sup>bc</sup>	5,08 ±0,04 <sup>de</sup>	0,91 ±0,019 <sup>d</sup>	2,86 ±0,35 <sup>c</sup>
Día 90 de maduración	5,10 ±0,09 <sup>defg</sup>	0,88 ±0,013 <sup>f</sup>	3,25 ±0,17 <sup>c</sup>	5,11 ±0,04 <sup>d</sup>	0,87 ±0,009 <sup>e</sup>	2,98 ±0,37 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Queso elaborado sin inóculo de las cepas de *E. coli* STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2.

<sup>2</sup>Queso inoculado con cepas de *E. coli* STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 (aproximadamente 10<sup>3</sup> ufc/ml).

<sup>3</sup>Tras inoculación de las cepas de *E. coli* STEC O140:H32, aEPEC ONT:H2 y el fermento láctico.

<sup>4</sup>Para una misma columna, superíndices con diferentes letras muestran diferencias significativas (p<0,05) entre los valores de los análisis. Los valores son el promedio de seis análisis y sus desviaciones estándares.

**Tabla V.2.** Evolución de los recuentos de las poblaciones de *E. coli stx-* y *eae-*, aEPEC, STEC y bacterias ácido lácticas durante los procesos de elaboración y maduración de queso elaborado con leche cruda de vaca.

Fase de producción	Queso control <sup>1</sup>		Queso inoculado <sup>2</sup>		
	<i>E. coli stx-</i> y <i>eae-</i>	BAL <sup>3</sup>	BAL	aEPEC	STEC
Leche	0,78 ±0,61 <sup>abd</sup>	5,36 ±0,19 <sup>a5</sup>	5,52 ±0,11 <sup>a</sup>	-	-
Tras inoculación <sup>4</sup>	-	-	9,53 ±0,07 <sup>b</sup>	3,49 ±0,28 <sup>aA</sup>	3,14 ±0,44 <sup>abA</sup>
Tras incubación	1,64 ±0,50 <sup>de</sup>	7,79 ±0,23 <sup>bd</sup>	8,24 ±0,21 <sup>cde</sup>	4,11 ±0,16 <sup>bA</sup>	3,67 ±0,20 <sup>beB</sup>
Cuajada recién cortada	2,34 ±0,24 <sup>e</sup>	8,67 ±0,12 <sup>c</sup>	8,43 ±0,15 <sup>de</sup>	4,55 ±0,16 <sup>cA</sup>	4,74 ±0,17 <sup>cA</sup>
Tras prensado	1,26 ±0,99 <sup>d</sup>	7,89 ±0,27 <sup>bd</sup>	8,52 ±0,11 <sup>e</sup>	4,73 ±0,17 <sup>cA</sup>	4,55 ±0,54 <sup>cdB</sup>
Tras salado y escurrido	1,59 ±0,80 <sup>de</sup>	7,51 ±0,34 <sup>be</sup>	8,06 ±0,18 <sup>cf</sup>	4,65 ±0,12 <sup>cA</sup>	4,12 ±0,25 <sup>deB</sup>
Día 7 de maduración	1,41 ±0,08 <sup>de</sup>	8,19 ±0,06 <sup>cd</sup>	8,06 ±0,07 <sup>cdf</sup>	4,63 ±0,06 <sup>cA</sup>	4,04 ±0,11 <sup>deB</sup>
Día 15 de maduración	1,11 ±0,36 <sup>cd</sup>	8,16 ±0,08 <sup>d</sup>	8,20 ±0,43 <sup>cde</sup>	4,53 ±0,08 <sup>cA</sup>	3,61 ±0,18 <sup>beB</sup>
Día 30 de maduración	0,99 ±0,30 <sup>bcd</sup>	8,09 ±0,17 <sup>d</sup>	9,07 ±0,41 <sup>g</sup>	3,96 ±0,13 <sup>bA</sup>	2,96 ±0,17 <sup>abB</sup>
Día 45 de maduración	<0,40 <sup>6</sup>	7,95 ±0,28 <sup>bd</sup>	7,99 ±0,30 <sup>f</sup>	3,06 ±0,21 <sup>dA</sup>	1,81 ±0,36 <sup>fB</sup>
Día 60 de maduración	<0,40	7,78 ±0,44 <sup>bd</sup>	7,83 ±0,13 <sup>f</sup>	2,90 ±0,18 <sup>dA</sup>	1,82 ±0,21 <sup>fB</sup>
Día 90 de maduración	<0,40	7,23 ±0,30 <sup>e</sup>	7,06 ±0,10 <sup>h</sup>	2,11 ±0,23 <sup>eA</sup>	0,88 ±0,20 <sup>gB</sup>

<sup>1</sup>Queso elaborado sin inóculo de las cepas de *E. coli* STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2.

<sup>2</sup>Queso inoculado con cepas de *E. coli* STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 (aproximadamente 10<sup>3</sup> ufc/ml).

<sup>3</sup>BAL, bacterias ácido lácticas.

<sup>4</sup>Tras inoculación de las cepas de *E. coli* STEC O140:H32, aEPEC ONT:H2 y el fermento láctico.

<sup>5</sup>Para una misma columna, superíndices con diferentes letras muestran diferencias significativas (p<0,05) entre los recuentos de ambas cepas. Mientras que en las filas de recuento de aEPEC y STEC, superíndices con diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas (p<0,05). Los valores (log ufc/ml o log ufc/g) medios y desviaciones estándar son el promedio de seis determinaciones.

<sup>6</sup>Por debajo del límite de detección de la metodología empleada.

Las poblaciones de *E. coli* aEPEC ONT:H2 y de STEC O140:H32 aumentaron en las primeras etapas de fabricación del queso inoculado, como también lo hizo la población propia (nativa) de *E. coli stx* y *eae* en el queso control (Tabla V.2). Fue en la cuajada donde STEC O140:H32 y la población de *E. coli stx* y *eae* del queso control presentaron sus mayores recuentos durante la elaboración del queso: 4,74 y 2,34 log ufc/g, respectivamente (Tabla V.2). Mientras, la cepa aEPEC ONT:H2 incrementó su población hasta el final del prensado, donde alcanzó 4,73 log ufc/g. El incremento de los recuentos de las cepas de *E. coli* en las etapas iniciales de fabricación del queso ha sido descrito en otros estudios con otras cepas patógenas de *E. coli* (D'Amico et al., 2010; Miszczycha et al., 2013; Peng et al., 2013). Esta multiplicación inicial es atribuida a las condiciones favorables de crecimiento, temperatura (próxima a 37°C) y pH (superior a 5), encontradas durante las primeras etapas de fabricación del queso (Maher et al., 2001). Otro momento importante en el incremento de las cepas de *E. coli* se observó en la cuajada (Tabla V.2). Este incremento se puede justificar por la concentración bacteriana, ya que la cuajada funciona como una barrera física atrapando las bacterias y expulsando el suero, concentrándolas hasta diez veces (Maher et al., 2001).

Como se ha comentado anteriormente, el comportamiento de ambas cepas de *E. coli* diareagénicas empezó a ser diferente después del prensado del queso ( $p < 0,05$ , Tabla V.2) y fue justo en esa etapa cuando los recuentos de STEC O140:H32 empezaron a disminuir, aunque fue solo después de 15 días de maduración cuando el descenso de los recuentos fue significativo ( $p < 0,05$ , Tabla V.2). Por otro lado, la población de aEPEC ONT:H2 inició su tendencia a la reducción tras el escurrido del queso, pero solo fue significativa ( $p < 0,05$ , Tabla V.2) a partir de 30 días de maduración lo que muestra una mayor supervivencia que la cepa STEC.

La cepa de STEC O140:H32 empezó la disminución de la población después del prensado, justo cuando el pH fue inferior a 5 (Tabla V.1), demostrando una mayor sensibilidad al pH que la cepa de aEPEC ONT:H2. En un trabajo realizado por Oh et al. (2014), en extracto de queso Cheddar, fue

estudiado el comportamiento de cepas de STEC en diferentes situaciones de pH, sal y ácido láctico, y los autores concluyeron que entre dichos obstáculos fue el pH el principal responsable del control de las cepas.

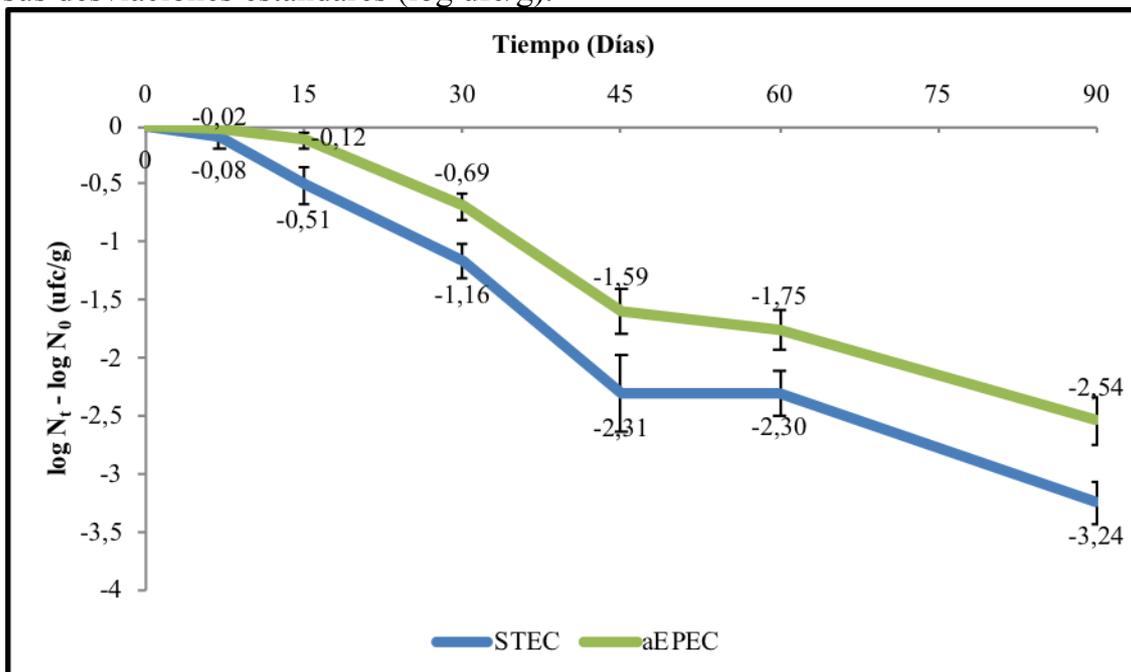
Como se ha comentado anteriormente la población de aEPEC ONT:H2 demostró una reducción significativa sólo a los 30 días (Tabla V.2), y también a partir de dicho momento la población de *E. coli stx*<sup>-</sup> y *eae*<sup>-</sup> del queso control se situó por debajo de 0,40 log ufc/g (Tabla V.2). A los 30 días de maduración es el momento en que ocurren cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en la  $a_w$  y de NaCl (Tabla V.1), sugiriendo que, al contrario de la cepa STEC O140:H32 que empezó su reducción con la bajada del pH, para la cepa aEPEC ONT:H2 fue necesario la combinación de ambos factores para su control. La supervivencia de *E. coli* patógenas durante la elaboración y maduración del queso es influenciada por la concentración de NaCl, la acidez, la temperatura de almacenamiento y también por el tiempo de maduración. Además, puede existir un efecto sinérgico entre ellos (Alemdar, 2016; Miszczycha et al., 2013).

En la Figura V.1 se observa la reducción a lo largo de la maduración del queso de la población STEC O140:H32 de aEPEC ONT:H2 con relación al nivel poblacional que cada cepa presentaba tras el escurrido posterior al salado, es decir, en el momento de su introducción en la cámara de maduración.

Durante la maduración, la población de STEC O140:H32 mostró una reducción de 1,16 log ufc/g a los 30 días (Figura V.1), volviendo sus recuentos a los niveles iniciales de inoculación (Tabla V.2). Mientras, la cepa aEPEC ONT:H2 en el mismo periodo experimentó una discreta reducción de 0,69 log ufc/g (Figura V.1), y fue a los 45 días de maduración cuando el descenso alcanzó 1,59 log ufc/g (Figura V.1) con lo que la población de dicha cepa se situó en valores muy similares a los inoculados (Tabla V.2). Respecto al nivel bacteriano al inicio de la maduración, después de 60 días de maduración la reducción de la población de las cepas de *E. coli* patógenas alcanzó 2,30 log ufc/g para STEC O140:H32 y 1,75 log ufc/g para aEPEC ONT:H2 (Figura V.1), si bien las poblaciones de ambas cepas aún eran detectables (1,82 y 2,90 log ufc/g, respectivamente, Tabla V.2). En diversos trabajos realizados con varios

tipos de queso y estudiando diversas cepas de *E. coli* a diferentes concentraciones iniciales de inóculo ( $10^1$ - $10^3$  ufc/ml), fue observado que a lo largo de 2 meses de maduración se produce una reducción efectiva en los recuentos de *E. coli* patógenas, aunque en ninguno se mostró una eliminación completa (Alemdar, 2016; D'Amico et al., 2010; Miszczycha et al., 2013; Peng et al., 2013).

**Figura V.1.** Reducción de la población de STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 a lo largo de la maduración del queso con relación al valor poblacional de cada cepa al inicio de la misma. Cada punto representa el promedio de seis análisis y sus desviaciones estándares (log ufc/g).



Al final de los 90 días de maduración de los quesos, la población de las cepas STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 se redujo en 3,24 y 2,54 log ufc/g, respectivamente (Figura V.1). Sin embargo, la población de STEC O140:H32 presentaba un recuento de 0,88 log ufc/g, mientras que aEPEC ONT:H2 fue de 2,11 log ufc/g (Tabla V.2). Así pues, en ese momento de la maduración se observó una supervivencia significativamente mayor de la cepa de aEPEC ( $p < 0,05$ , Tabla V.2 y Figura V.1) lo que muestra su mejor capacidad de adaptación a las condiciones intrínsecas que se suceden a lo largo del proceso productivo del queso. Otros investigadores ya observaron una variación en el

comportamiento de cepas de diferentes serogrupos durante la elaboración del queso (Miszczycha et al., 2013; Peng et al., 2013).

Los principales mecanismos en la supervivencia de STEC durante la producción del queso son aquéllos que están involucrados en las respuestas al estrés ácido y osmótico, que pueden actuar individualmente o combinados (Peng et al., 2011). Uno de los principales mecanismos de respuesta al estrés en general en *E. coli* es la activación del gen *rpoS* (Peng et al., 2011). Peng et al (2013) al estudiar el comportamiento de 5 cepas de *E. coli* de distintos serogrupos, encontraron que la cepa que mostró mayor supervivencia durante la maduración del queso fue la que presentó problemas con la expresión fenotípica del gen *rpoS*, así como la menor resistencia en pruebas de inactivación térmica y en condiciones de acidez. Ellos concluyeron que probablemente la supervivencia de las cepas de *E. coli* en queso estaría correlacionada más con la capacidad de respuesta a la suma de las pequeñas tensiones, que a la respuesta a tensiones más fuertes aplicadas para la selección de las cepas.

Además de los otros factores responsables de la resistencia comentados anteriormente, una hipótesis que avalaría la menor supervivencia de la cepa STEC O140:H32 vendría determinada porque STEC son portadoras de los profagos de los genes *stx* que, durante el estrés ocasionado durante la producción y la maduración del queso, pueden inducir el ciclo lítico y por lo tanto acelerar la reducción de la población de STEC durante la maduración del queso (Miszczycha et al., 2013; Peng et al., 2013).

Las bacterias ácido-lácticas de ambos quesos aumentaron en la cuajada del queso y fueron levemente disminuyendo a lo largo de la maduración, presentando recuentos de 7,06 log ufc/g para el queso inoculado y 7,23 log ufc/g para el queso control sin inóculo de las cepas de *E. coli* (Tabla V.2). Estas bacterias son las principales productoras de ácido láctico en el queso y consecuentemente son responsables de la bajada del pH, jugando un papel fundamental en el control de las bacterias patógenas en el queso (Alemdar, 2016). Además, algunas especies de dichas bacterias son capaces de

producir bacteriocinas que son efectivas en el control de algunos microorganismos patogénicos (Yoon et al., 2016).

#### **4. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES**

La reducción de la población de las cepas de STEC O140:H32 y aEPEC ONT:H2 durante la maduración (90 días) de queso elaborado con leche cruda de vaca fue de 3,24 y 2,54 log ufc/g. Sin embargo, considerando todo el proceso productivo de elaboración del queso, el descenso a los 90 días de maduración fue de 2,3 log ufc/g en la cepa de STEC y menos de 1,5 log ufc/g en la de aEPEC con relación a la población inicialmente presente en la leche.

Los procesos convencionales de elaboración y maduración de quesos a partir de leche cruda de vaca no garantizan la inactivación de cepas STEC no-O157 y aEPEC cuando se elabora queso con leche contaminada con niveles altos ( $10^3$  ufc/ml) de dichas bacterias, ya que siguen detectándose significativamente después de 90 días de maduración, especialmente aEPEC.

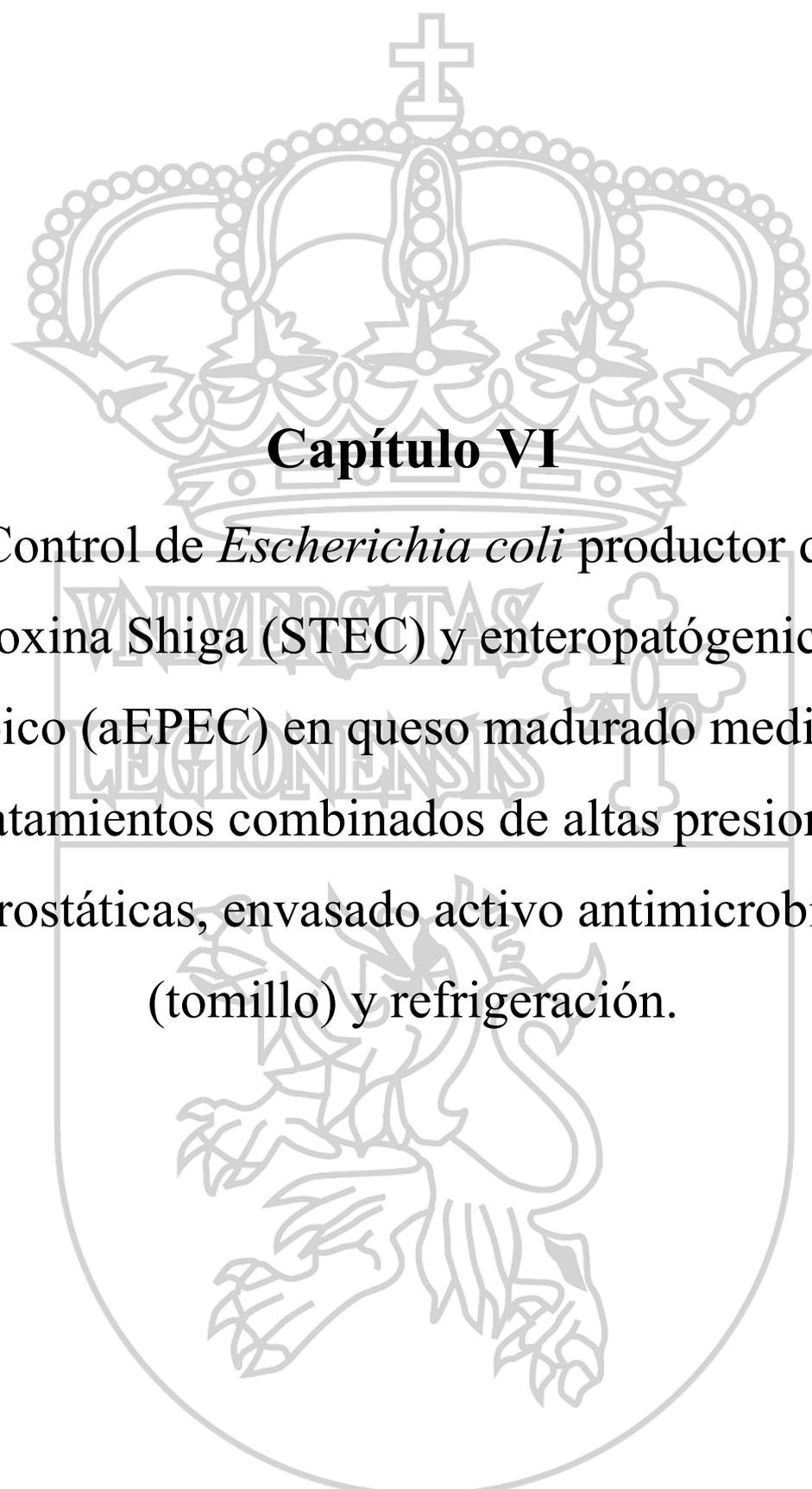
## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Alemdar, S., 2016. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the ripening of herby cheese manufactured from raw milk. *J. Food Heal. Sci.* 2, 49–56. doi:10.3153/JFHS16005
- Álvarez-Suárez, M.-E., Otero, A., García-López, M.-L., Dahbi, G., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J., Santos, J.A., 2016. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *Int. J. Food Microbiol.* 236, 148–154. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.035
- Beraldo, L.G., Borges, C.A., Maluta, R.P., Cardozo, M.V., Rigobelo, E.C., de Ávila, F.A., 2014. Detection of Shiga toxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. *Vet. Microbiol.* 170, 162–166. doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.023
- CDC, 2017. FoodNet 2015 Annual Foodborne Illness Surveillance Report | FoodNet | CDC [WWW Document]. *Foodborne Dis. Act. Surveill. Netw.* URL <https://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2015.html> (accessed 10.5.17).
- D'Amico, D.J., Druart, M.J., Donnelly, C.W., 2010. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. *J. Food Prot.* 73, 2217–2224.
- EFSA, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14, 1–231. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A.M., Gomes, T.A.T., 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 137–149. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x
- Kolenda, R., Burdukiewicz, M., Schierack, P., 2015. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1–12. doi:10.3389/fcimb.2015.00023
- Kosikowski, F., 1978. Analysis, in: Kosikowski, F. (Ed.), *Cheese and Fermented Milk Foods*. Brooktondale, New York, pp. 560–597.
- Lekkas, C., Kakouri, A., Paleologos, E., Voutsinas, L.P., Kontominas, M.G., Samelis, J., 2006. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12°C. *Food Microbiol.* 23, 268–276. doi:10.1016/j.fm.2005.03.008
- Little, C.L., Rhoades, J.R., Sagoo, S.K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., McLaughlin, J., 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiol.* 25, 304–312. doi:10.1016/j.fm.2007.10.007

- 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 cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2035–2041. doi:10.1128/AEM.02089-10
- Maher, M.M., Jordan, K.N., Upton, M.E., Coffey, A., 2001. Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *J. Appl. Microbiol.* 90, 201–207. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01232.x
- Marozzi, S., De Santis, P., Lovari, S., Condoleo, R., Bilei, S., Marcianò, R., Mezher, Z., 2016. Prevalence and molecular characterisation of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk cheeses from Lazio region, Italy. *Ital. J. Food Saf.* 5, 4–6. doi:10.4081/ijfs.2016.4566
- Miszczucha, S.D., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus-Aziza, F., Montel, M.-C., Thevenot-Sergentet, D., 2013. Behavior of different Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in various experimentally contaminated raw-milk cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 150–158. doi:10.1128/AEM.02192-12
- Najand, L.M., Ghanbarpour, R., 2006. A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese. *Vet. Arh.* 76, 531–536.
- Oh, J.-H., Vinay-Lara, E., McMinn, R., Glass, K.A., Johnson, M.E., Steele, J.L., 2014. Evaluation of NaCl, pH, and lactic acid on the growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a liquid Cheddar cheese extract. *J. Dairy Sci.* 97, 6671–6679. doi:10.3168/jds.2014-7946
- Omarak, R.A., Hinenoya, A., Awasthi, S.P., Iguchi, A., Shima, A., Elbagory, A.-R.M., Yamasaki, S., 2016. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.* 221, 69–76. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.009
- Pearson, J.S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., Hartland, E.L., 2016. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu. Rev. Genet.* 50, 493–513. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035138
- Peng, S., Hoffmann, W., Bockelmann, W., Hummerjohann, J., Stephan, R., Hammer, P., 2013. Fate of Shiga toxin-producing and generic *Escherichia coli* during production and ripening of semihard raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* 96, 815–823. doi:10.3168/jds.2012-5865
- Peng, S., Tasara, T., Hummer Johann, J., Stephan, R., 2011. An overview of molecular stress response mechanisms in *Escherichia coli* contributing to survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during raw milk cheese production. *J. Food Prot.* 74, 849–864. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-469

- Smith, J.L., Fratamico, P.M., Launchi, N.R., 2015. Update on non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* as a foodborne pathogen: analysis and control, in: Sofos, J. (Ed.), *Advances in Microbial Food Safety*. Elsevier, Cambridge, pp. 3–32. doi:10.1533/9781782421153.1.3
- Spano, G., Goffredo, E., Beneduce, L., Tarantino, D., Dupuy, A., Massa, S., 2003. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 73–76. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01252.x
- Torres, A.G., 2016. *Escherichia coli* in the Americas. Springer, Gewerbestrasse. doi:10.1007/978-3-319-45092-6
- Vieira, M.A., Gomes, T.A.T., Camargo, C.H., dos Santos, L.F., Hernandez, R.T., Dias, R.C.B., Pinheiro, S.R.S., 2016. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. *J. Med. Microbiol.* 65, 998–1006. doi:10.1099/jmm.0.000313
- Xu, Y., Bai, X., Zhao, A., Zhang, W., Ba, P., Liu, K., Jin, Y., Wang, H., Guo, Q., Sun, H., Xu, J., Xiong, Y., 2016. Genetic diversity of intimin gene of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from human, animals and raw meats in China. *PLoS One* 11, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0152571
- Yoon, Y., Lee, S., Choi, K.-H., 2016. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control* 63, 201–215. doi:10.1016/j.foodcont.2015.11.013
- 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 cheese within a 3-year monitoring program. *J. Food Prot.* 73, 88–91.





## Capítulo VI

Control de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) y enteropatógeno atípico (aEPEC) en queso madurado mediante tratamientos combinados de altas presiones hidrostáticas, envasado activo antimicrobiano (tomillo) y refrigeración.



## 1. INTRODUCCIÓN

STEC y aEPEC están presentes en el intestino de los rumiantes, principalmente en el ganado bovino (Kolenda et al., 2015; Smith et al., 2015). Además, en diversos estudios se han aislado cepas de STEC y aEPEC en leche y sus derivados (Álvarez-Suárez et al., 2016; D'Costa et al., 2013; EFSA, 2016; Madic et al., 2011; Marozzi et al., 2016; Mohammadi y Abiri, 2013; Otero et al., 2013; Trevisani et al., 2013), por lo que los quesos elaborados con leche cruda pueden ser un vehículo importante de transmisión de estos grupos patógenos de *E. coli*.

Para satisfacer la creciente demanda de los consumidores de productos alimenticios considerados naturales, algunos métodos de conservación de alimentos pueden ser una alternativa real. Entre ellos, se pueden citar los que incluyen aceites esenciales que poseen actividad antibacteriana (Burt, 2004). Entre los múltiples aceites esenciales conocidos, el de TO demuestra actividad antibacteriana contra una amplia gama de especies bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas (Villa y Veiga-Crespo, 2014). Su composición posee varios compuestos bioactivos, incluyendo flavonoides y ácidos fenólicos, de los cuales el timol, p-cimeno,  $\alpha$ -terpinoleno y carvacrol son los principales constituyentes que poseen efecto bactericida (Assiri et al., 2016; Burt, 2004). Los aceites esenciales se pueden aplicar directamente en los alimentos o indirectamente mediante el uso de polímeros como portadores de estos aceites, conocidos como sistemas de envasado activo (Kapetanakou y Skandamis, 2016).

Uno de los desarrollos más recientes en la industria alimentaria fue la implementación y el diseño de tecnologías de procesamiento no térmico, con el objetivo de reducir los impactos generados por los tratamientos térmicos (Soliva-Fortuny et al., 2011). Las APH constituyen una de las tecnologías más innovadoras para la conservación de los alimentos, que no utiliza para ello el calor y proporciona unas pérdidas mínimas en su calidad. El tratamiento en condiciones adecuadas puede inactivar microorganismos patogénicos y alterantes, proporcionando seguridad alimentaria y prolongando la vida útil de los alimentos. Además, es capaz de conservar el color, el sabor, los nutrientes y

la textura inherente de los alimentos (Morris et al., 2007; Stoica et al., 2013; Tao et al., 2014). Uno de los inconvenientes de esta tecnología es que puede dar lugar también a daños sub-letales en algunos microorganismos que en condiciones favorables se pueden volver a recuperar. Sin embargo, estas células vegetativas dañadas son más sensibles a otros factores, por lo tanto la combinación del tratamiento con otras tecnologías de conservación como el envasado activo con aceite esencial puede incrementar los efectos de la inactivación (Martínez-Rodríguez et al., 2012).

El objetivo del trabajo recogido en este capítulo ha sido establecer el efecto de los tratamientos de altas presiones hidrostáticas y envasado activo con extracto de tomillo sobre dos cepas potencialmente patógenas de *E. coli* (STEC y aEPEC) en queso madurado elaborado a partir de leche cruda de vaca, valorando su potencialidad para el control del riesgo sanitario asociado a estos grupos patógenos en dicho producto alimenticio.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. CEPAS

Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron O140:H32 productora de toxina Shiga (STEC MK116C19) y ONT:H2 enteropatogénica atípica (aEPEC MK127C9), ambas procedentes de muestras de leche de vaca (tal y como se señala en los Capítulos II y III). Fueron elegidas teniendo en cuenta su mejor comportamiento frente a diferentes situaciones de estrés (pH y NaCl, Capítulo IV). Las cepas de *E. coli* fueron recuperadas, a partir de CryoInstant® almacenados a -30 °C, en TSB-YE e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Para la preparación del inóculo las cepas de *E. coli* fueron sembradas en agar SMAC y las colonias puras fueron aisladas de las placas y resembradas en 30 ml de TSB-YE e incubadas a 37 °C durante 6 horas en agitación (150 rpm), tras lo cual una alícuota de 30 µl del inóculo (6 horas) fue transferida a 30 ml de TSB-YE que fue incubado nuevamente en las mismas condiciones descritas anteriormente durante 18 horas. Para preparar los inóculos, volúmenes iguales de los cultivos de ambas cepas fueron mezclados y se realizó una dilución seriada en solución salina peptonada para la obtención de una concentración final de 10<sup>8</sup> ufc/ml de cada cepa.

### 2.2. PREPARACIÓN DE LAS PORCIONES DE QUESO E INOCULACIÓN DE LAS MISMAS

Fueron utilizadas porciones de queso de 45 días de maduración, fabricado con leche de vaca de acuerdo a lo señalado en el Capítulo V. El queso tenía un pH de 5,14, una a<sub>w</sub> de 0,94 y un contenido de sal de 2,11%. Antes de proceder con la inoculación, los quesos fueron cortados en forma de cuñas de 9 x 4 x 0,4 cm con un peso aproximado de 10 g.

Para la inoculación de los quesos, en placas de Petri se depositaron 10 ml del inóculo de las cepas aEPEC ONT:H2 y STEC O140:H32. A continuación las cuñas de queso fueron sumergidas durante 30 segundos por cada lado, y

posteriormente se traspasaron a una nueva placa de Petri durante 30 segundos para escurrir el exceso del inóculo. La concentración de *E. coli* en las porciones de queso tras la inoculación fue alrededor de  $10^7$  ufc/g.

### 2.3.PROCEDIMIENTOS DE CONTROL MICROBIANO ENSAYADOS

Se consideraron 5 condiciones distintas: (I) porciones de queso sin inóculo de *E. coli*, (II) cuñas de queso inoculadas con *E. coli* y sin tratamiento, (III) porciones de queso inoculadas con *E. coli* y tratadas con APH, (IV) cuñas de queso inoculadas con *E. coli* y recubiertas con envase activo de extracto de TO, y (V) porciones de queso inoculadas con *E. coli* y aplicación de tratamientos combinados de APH y envasado activo con biopelículas de TO.

### 2.4.TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Las cuñas de queso inoculadas fueron envasadas a vacío empleando el equipo Multivac B.V A300 (Emos .A, Barcelona, España) en bolsas plásticas dobles Flex NB 020-100-STA/D (Pargon, España). Inmediatamente fueron presurizadas a 300 MPa durante 10 minutos en el equipo FPG 7100: Serie 9/2C Foodlab (Standsted Fluid Power Ltd., Essex, RU). El fluido de presurización (agua y 30% de propilenoglicol) y el recipiente de almacenamiento se encontraban a 12 °C al inicio del tratamiento. Tras el tratamiento, las dobles bolsas fueron abiertas y las cuñas de queso bien se envasaron directamente en atmósfera modificada (tal y como se describe más adelante) o bien se cubrieron con biopelículas de TO (envase activo de TO) antes de dicho envasado.

### 2.5.ENVASE ACTIVO ANTIMICROBIANO DE TOMILLO

El envase activo se llevó a cabo con biopelículas de TO. Para su preparación se utilizó aceite comercial Thyme CO<sub>2</sub>-SE Extract (Guinness Chemicals Ltd., Portlaoise, Irlanda), cuya composición se indica en la Tabla VI.1, disuelto en una proporción de 100 mg/ml en solución acuosa de

DMSO 10% con Tween 80 al 0,5%. Se prepararon biopelículas compuestas de 2% (v/v) de extracto de TO, 3% de gelatina y 1% de agar-agar, de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.3.2 del Capítulo V.

**Tabla VI.1.** Composición en aceites esenciales del extracto de tomillo - Thyme CO<sub>2</sub>-SE Extract (Guinness Chemicals Ltd., Portlaoise, Irlanda).

<b>Componente</b>	<b>Contenido (%) (g/g)</b>
Alpha Pinene	0,26
Beta Myrcene	0,31
p-Cymene	11,7
Limonene	0,24
1,8 Cineole	0,57
Gamma Terpinene	4,1
Linalool	1,7
Borneol	0,72
Thymol	61,6
Carvacrol	4,0
Caryophyllene	2,7
<b>Total</b>	<b>87,9</b>

Para la aplicación de las biopelículas de TO fueron utilizadas dos biopelículas por cuña de queso. Primeramente, se colocaba la biopelícula de TO en una bandeja de polietileno (20-15cm), encima se depositaba la cuña de queso y por último otra biopelícula de TO era colocada en la parte superior del queso. Con ayuda de pinzas estériles, los bordes de las cuñas eran recubiertos con las biopelículas, intentando que toda ella mantuviera contacto directo con éstas.

## 2.6. TRATAMIENTO COMBINADO DE APH Y ENVASADO ACTIVO DE TO

Para evaluar el efecto combinado de los tratamientos de APH y envase activo de TO, tras el tratamiento de APH las cuñas de queso se recubrieron de biopelículas de TO por el procedimiento señalado en el apartado anterior.

## 2.7. ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA Y ALMACENAMIENTO A REFRIGERACIÓN

Todas las cuñas de queso, inmediatamente después de aplicar los tratamientos, fueron puestas en bandejas de polietileno (20-15cm) de baja densidad (dos cuñas de queso por bandeja) e introducidas en bolsas plásticas ML40-G (Krehalon Industrie B. V., Holanda), cuyas características de permeabilidad son las siguientes:

- a) permeabilidad al O<sub>2</sub> (23 °C; 80% HR) 20 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24h/bar,
- b) permeabilidad al CO<sub>2</sub> (23 °C; 80% HR) 100 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24h/bar,
- c) permeabilidad al vapor de agua (40 °C; 90% HR) 17 g/m<sup>2</sup>/24h.

Las bandejas fueron envasadas en atmósfera modificada, compuesta de 30% CO<sub>2</sub> y 70% N<sub>2</sub>, lo que se llevó a cabo con una envasadora Multivac B.V A300 (Emos. A, Barcelona, España). Después de los tratamientos, las muestras de queso se conservaron a refrigeración (7±1 °C).

## 2.8. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras inicial fue realizada después de la inoculación de las cepas de *E. coli* y, en su caso, después del tratamiento de APH. Asimismo, se realizó la toma de muestras en los días 7, 14 y 28 de almacenamiento. Para ello, eran retirados de la cámara frigorífica dos envases de cada condición a fin de determinar la población de las cepas de *E. coli* y BAL. Además, la medición de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> se realizó en todos los envases que constituían la muestra (antes de su apertura), utilizando el equipo CheckMate 9900 (PBI-Dansensor, Dinamarca).

Cada tratamiento se estudió en dos lotes de queso. Así pues, se obtuvieron cuatro valores (2 lotes x 2 muestras por lote) para cada recuento realizado.

## 2.9. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Tras la toma de muestras, las cuñas de queso de 10 g eran colocadas en bolsas de homogenización estériles a las que se añadían 90 ml de solución salina al 0,85% con peptona al 0,1%, obteniendo una dilución de 1:10. Estas mezclas

eran homogeneizadas en un homogeneizador BagMixer-400 (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, Francia) durante 180 segundos y a partir del homogeneizado resultante se realizaron las oportunas diluciones decimales también con solución salina peptonada.

### 2.9.1. Bacterias ácido-lácticas

Para el recuento de las BAL se sembró 1 ml de las diluciones del homogenizado en la profundidad de placas de agar MRS y al final se añadió una sobrecapa del mismo medio. Posteriormente se incubaron las placas a 30 °C durante 48 horas.

### 2.9.2. *E. coli*

El recuento de las células intactas de *E. coli* fue realizado en el medio selectivo TBX para lo que 1 ml de las diluciones del homogenizado era distribuido por profundidad en el medio. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Para el recuento total de la población de *E. coli* (células dañadas + células intactas) se utilizó el método *Thin Agar Layer* con modificaciones (TAL<sub>m</sub>, De Lamo-Castellví et al., 2006). Para ello, a placas con 20 ml de TBX se añadió una primera capa de 7 ml de TSA-YE. Tras la solidificación, se añadió 1 ml de las oportunas diluciones del homogeneizado inicial y para finalizar fue añadida una segunda capa (7 ml) del mismo medio nutritivo (TSA-YE) fundido, con la correspondiente distribución y espera posterior para su solidificación. La incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas.

El medio TBX fue utilizado en los dos métodos de recuento debido a que, por las características de las cepas utilizadas, era posible diferenciarlas en este medio: las colonias blancas de 1,5-2 mm de diámetro era consideradas como correspondientes a la cepa de aEPEC MK127C9 (beta-glucuronidasa negativa), y las colonias azuladas de 1,5-2 mm de diámetro como pertenecientes a la cepa STEC MK116C19 (beta-glucuronidasa positiva). Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

La cuantía de las células de *E. coli* dañadas fue calculada por la diferencia entre la población total de *E. coli* (recuento en TLA<sub>m</sub>) y la población de células de *E. coli* intactas (recuento en TBX) mediante la fórmula:  $\log N_t(\text{TLA}_m) - \log N_t(\text{TBX})$ .

La reducción en la población total de *E. coli* fue calculada por la diferencia de los recuentos en TLA<sub>m</sub> en el tiempo 0 con el momento analizado:  $\log N_0 - \log N_t$ .

## 2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de los recuentos fueron transformados en  $\log_{10}$  y sometidos a análisis de varianza (ANOVA) para comparar los efectos de los tratamientos a lo largo del tiempo de estudio, mientras que el modelo lineal general univariado fue utilizado para comparar los efectos de tratamiento, tiempo de almacenamiento, cepa (aEPEC y STEC) y sus interacciones. Las diferencias entre los efectos se evaluaron mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los recuentos de las cepas de aEPEC ONT:H2 y STEC O140:H32 a lo largo del tiempo en queso almacenado a refrigeración y envasado en atmósfera modificada con o sin ser tratado con APH, envase activo de TO y la combinación de ambos (APH + envase activo de TO) se muestran en la Tabla VI.2. Mientras que la evolución de los gases que componían el sistema de envasado se presenta en la Figura VI.1.

En las porciones de queso sin inóculo de *E. coli* no se detectó dicha bacteria en las muestras tomadas a lo largo del experimento.

Las cuñas de queso que tras la inoculación con *E. coli* únicamente se envasaban en atmósfera modificada mostraron una leve reducción en los recuentos de aEPEC y STEC durante su almacenamiento a refrigeración (Tabla VI.2). Así, la población de aEPEC se redujo 0,21 log ufc/g a los 28 días (Tabla VI.2) sin diferencia significativa a lo largo del tiempo ( $p > 0,05$ ), mientras que la población de STEC mostró una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) a partir de los 14 días, alcanzando un descenso de 0,38 log ufc/g al final de los 28 días de almacenamiento (Tabla VI.2). Estos resultados muestran que las condiciones comerciales de conservación, temperatura (7 °C) y atmósfera modificada (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 30/70%), produjeron un ligero efecto bacteriostático sobre las cepas estudiadas (Tabla VI.2). Estudios en queso demostraron que la temperatura de 8 °C es efectiva en el control del crecimiento de *E. coli* O157:H7 (Kasrazadeh y Genigeorgis, 1995), así como que la atmósfera modificada (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 60/40%) es efectiva en el control de *E. coli* (Arvanitoyannis et al., 2011). El contenido de CO<sub>2</sub> en los envases presentó una leve disminución a lo largo del almacenamiento, mientras que el contenido de O<sub>2</sub> experimentó un leve incremento (Figura VI.1).

**Tabla VI.2.** Evolución de la población de *E. coli* aEPEC ONT:H2 y STEC O140:H32 en cuñas de queso almacenado durante 28 días a 7 °C en atmósfera modificada.

Tiempo	aEPEC				STEC			
	Control <sup>2</sup>	TO <sup>3</sup>	APH <sup>4</sup>	APH+TO <sup>5</sup>	Control	TO	APH	APH+TO
0	<sup>1</sup> 6,90±0,18 <sup>a</sup>	6,90±0,18 <sup>a</sup>	6,90±0,18 <sup>a</sup>	6,90±0,18 <sup>a</sup>	6,93±0,03 <sup>a</sup>	6,93±0,03 <sup>a</sup>	6,93±0,03 <sup>a</sup>	6,93±0,03 <sup>a</sup>
Tras APH	-	-	4,76±0,12 <sup>b</sup>	4,76±0,12 <sup>b</sup>	-	-	6,46±0,09 <sup>a</sup>	6,46±0,09 <sup>a</sup>
7	6,94±0,16 <sup>a</sup>	5,97±0,21 <sup>b</sup>	4,96±0,30 <sup>b</sup>	4,25±0,43 <sup>bc</sup>	6,91±0,09 <sup>a</sup>	5,81±0,25 <sup>b</sup>	6,13±0,09 <sup>b</sup>	4,53±0,32 <sup>b</sup>
14	6,84±0,12 <sup>a</sup>	5,59±0,09 <sup>bc</sup>	4,73±0,22 <sup>b</sup>	3,36±0,40 <sup>cd</sup>	6,75±0,09 <sup>b</sup>	5,41±0,23 <sup>b</sup>	5,89±0,09 <sup>c</sup>	4,06±0,10 <sup>b</sup>
28	6,69±0,24 <sup>a</sup>	5,23±0,47 <sup>c</sup>	4,85±0,48 <sup>b</sup>	2,60±1,17 <sup>d</sup>	6,55±0,09 <sup>c</sup>	4,70±0,45 <sup>c</sup>	5,42±0,09 <sup>d</sup>	2,13±1,16 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Para una misma columna, superíndices con diferentes letras muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los recuentos. Los recuentos (en log ufc/g) son el promedio de cuatro análisis y sus desviaciones estándares.

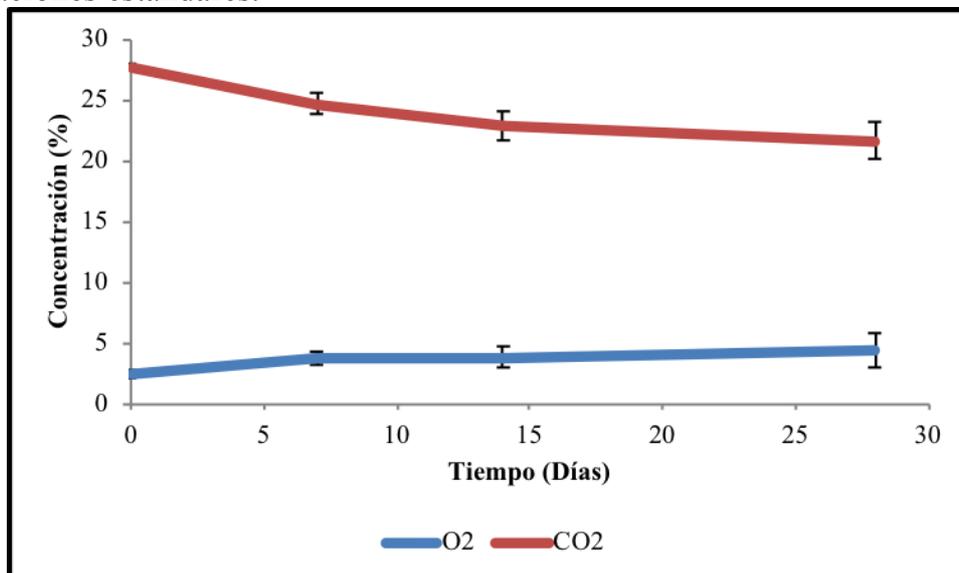
<sup>2</sup>Cuñas de queso inoculadas con *E. coli* sin tratamiento adicional previo al envasado en atmósfera modificada.

<sup>3</sup>Cuñas de queso inoculadas con *E. coli*, rodeadas con biopelículas de tomillo al 2% antes de su envasado en atmósfera modificada.

<sup>4</sup>Cuñas de queso inoculadas con *E. coli* y tratadas con altas presiones hidrostáticas (300 MPa durante 10 minutos) antes de su envasado en atmósfera modificada.

<sup>5</sup>Cuñas de queso inoculadas con *E. coli*, tratadas con altas presiones hidrostáticas (300 MPa durante 10 minutos) y rodeadas con biopelículas de aceite esencial de tomillo al 2% antes de su envasado en atmósfera modificada.

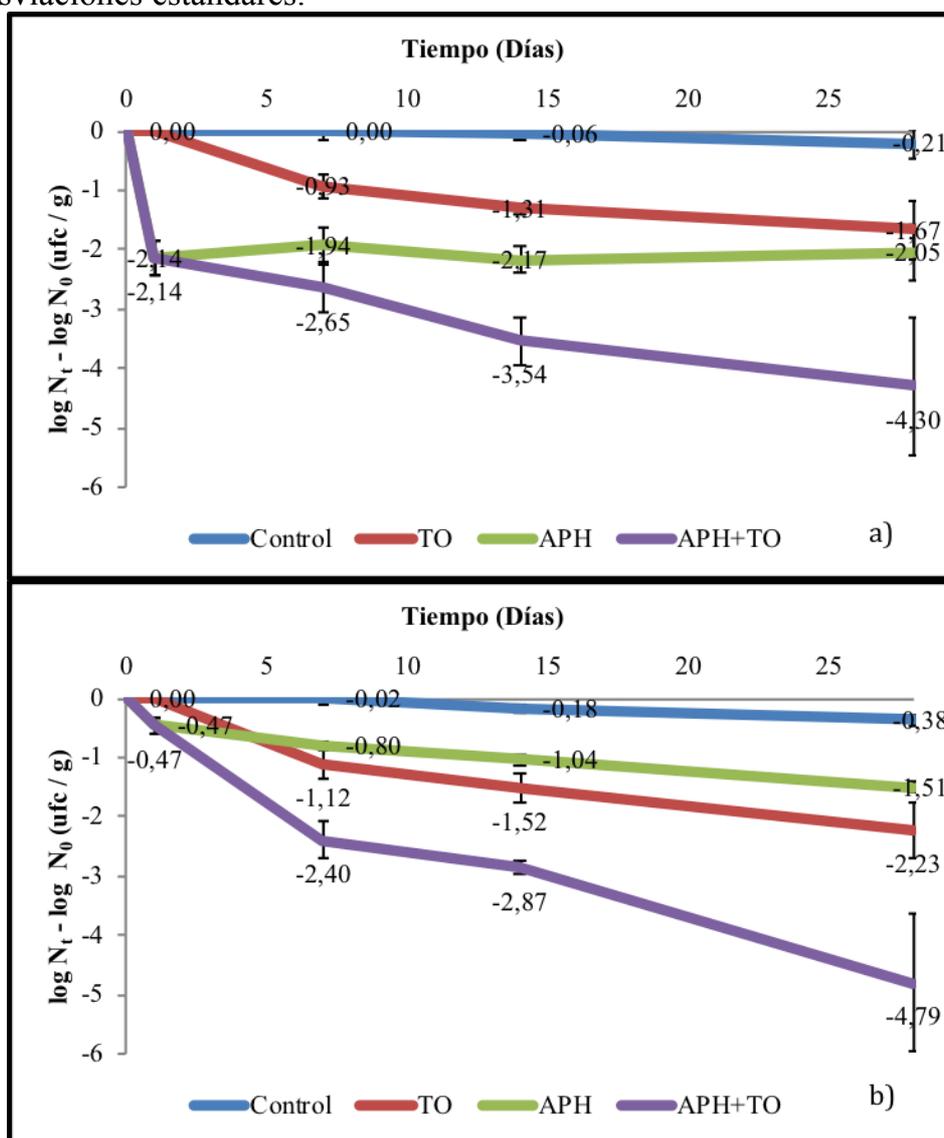
**Figura VI.1.** Evolución de la composición de los gases O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en los envases de cuñas de queso almacenado durante 28 días a 7 °C en atmósfera modificada (30% CO<sub>2</sub> /70% N<sub>2</sub>). Cada punto representa el promedio de diez análisis y sus desviaciones estándares.



El efecto de los envases activos de TO, de APH y de la combinación de ambos en las cepas de aEPEC y STEC inoculadas en queso madurado elaborado con leche cruda y almacenado a 7 °C en atmósfera modificada (30% CO<sub>2</sub> /70% N<sub>2</sub>) se muestra en la Figura VI.2, en la que se presenta la reducción de la población de *E. coli* a lo largo del tiempo en las diferentes condiciones ensayadas. El análisis estadístico (modelo lineal general univariado) mostró que los recuentos de *E. coli* en el queso fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) influenciados por la cepa, el tratamiento y el tiempo de almacenamiento. Para ambas cepas, el tratamiento combinado fue el que presentó mayor efecto antimicrobiano ( $p < 0,05$ ), seguido por el de altas presiones y el envasado activo de TO, respectivamente (Tabla VI.2 y Figura VI.2).

Los envases activos de TO fueron capaces de reducir 0,93 y 1,12 log ufc/g la población de las cepas de aEPEC y STEC, respectivamente, en la primera semana de almacenamiento (Figura VI.2). Durante el posterior almacenamiento la inactivación fue progresiva. Al final de los 28 días, la reducción fue de 1,67 log ufc/g para la cepa de aEPEC y de 2,23 log ufc/g para STEC (Figura VI.2).

**Figura VI.2.** Reducción de aEPEC ONT:H2 (a) y STEC O140:H32 (b) en cuñas de queso almacenado durante 28 días a 7 °C en atmósfera modificada bien sin intervención adicional (control) o tras aplicar diversos tratamientos antimicrobianos: envase activo de tomillo al 2% (TO), altas presiones hidrostáticas (300 MPa-10 min, APH), aplicación de altas presiones hidrostáticas (300 MPa-10 min) combinada con envase activo de tomillo al 2% (APH+TO). Cada punto representa el promedio de cuatro análisis expresados en log ufc/g y sus desviaciones estándares.



En un estudio realizado en queso feta inoculado con *E. coli* O157:H7 y la aplicación directa de 0,1ml/100g de aceite de tomillo sobre los quesos fue observada una reducción semejante (Govaris et al., 2011). Aunque el efecto de la aplicación directa pueda presentar reducciones significativas, este método posee inconvenientes como la rápida interacción entre el compuesto

antimicrobiano y los componentes de los alimentos que pueden disminuir la eficacia durante el almacenamiento. Por el contrario, cuando el compuesto antimicrobiano se aplica a través de envases activos el compuesto activo se libera gradualmente dentro del envase a lo largo de toda la vida útil del producto (Kapetanakou y Skandamis, 2016).

El tratamiento de APH logró una reducción inicial en aEPEC de 2,14 log ufc/g, mientras que en STEC se observó una inhibición únicamente de 0,47 log ufc/g (Figura VI.2) demostrando ser más resistente a las altas presiones que la cepa aEPEC. La población de aEPEC en queso tratado con APH se mantuvo durante todo almacenamiento, mientras que por el contrario la de STEC siguió disminuyendo, alcanzando a los 28 días una reducción de 1,51 log ufc/g con relación al inóculo inicial (Figura VI.2). La continua disminución del nivel de la cepa de STEC puede ser debido el efecto sinérgico producido por el CO<sub>2</sub> y el tratamiento de APH. Dicho tratamiento puede ocasionar pequeños daños en la membrana de las células bacterianas, lo que podría facilitar la penetración de CO<sub>2</sub> en la célula, provocando su posterior inactivación (Al-Nehlawi et al., 2014).

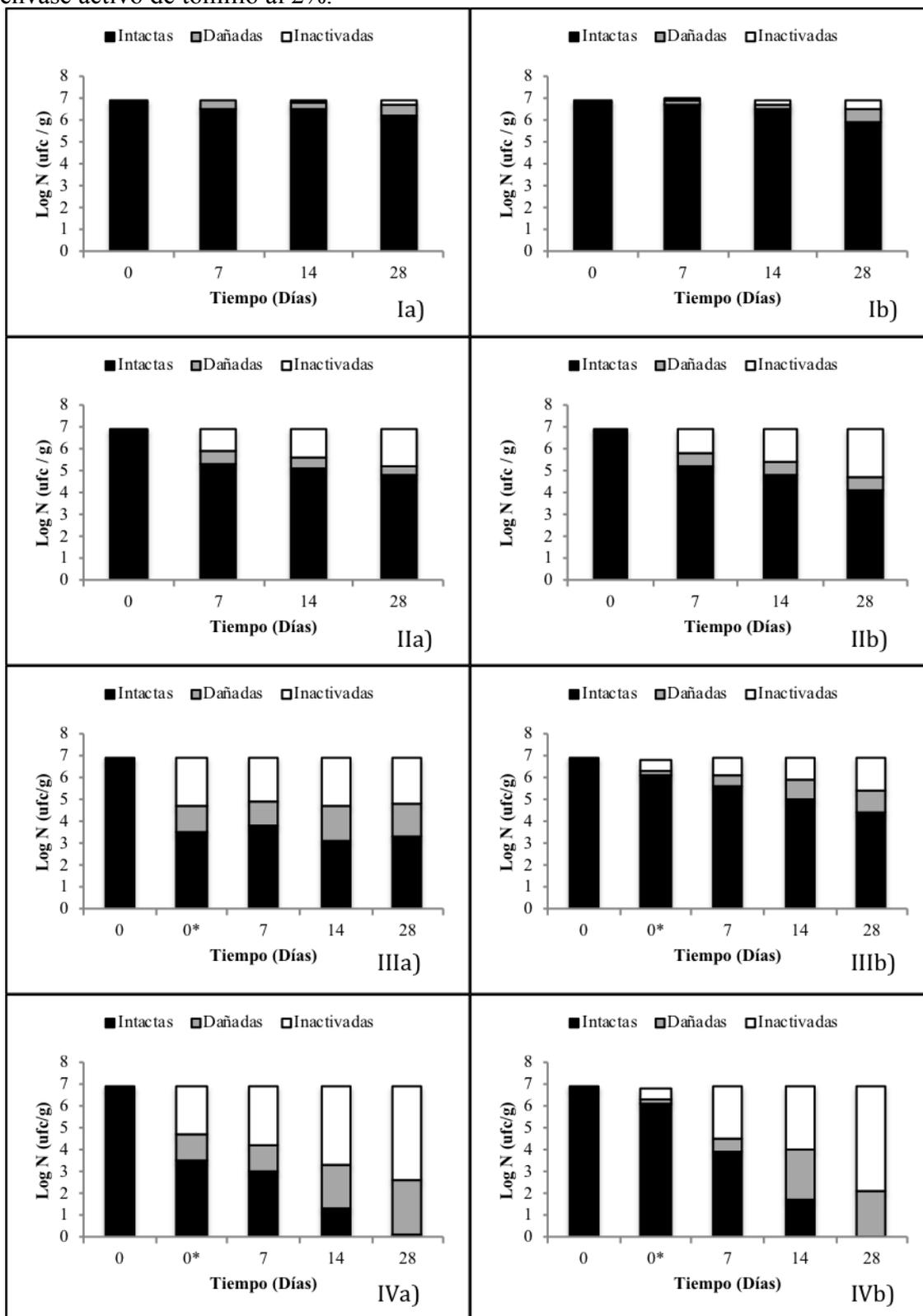
En las mismas condiciones de tiempo y presión que nuestro trabajo y en quesos inoculados con cepas de *E. coli* O59:H21 y O157:H7, De Lamo-Castellví et al. (2006) observaron reducciones de 2,25 y 1,96 log ufc/g, respectivamente, cuyo grado de inactivación fue muy semejante al mostrado sobre la cepa aEPEC de nuestro trabajo. El efecto del tratamiento de altas presiones se mostró más efectivo en la cepa de aEPEC hasta los 14 días de almacenamiento ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, a los 28 días el efecto del tratamiento de APH en ambas cepas no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Otros estudios demuestran que hay una diferencia de resistencia a las presiones entre cepas de *E. coli* (Benito et al., 1999; Hsu et al., 2015; Reineke et al., 2015). Uno de los factores importantes en la barorresistencia es la activación del gen *rpoS* implicado en la protección de las células a factores de estrés (Robey et al., 2001). En otro estudio realizado con *E. coli* O157:H7 se presenta que la inactivación de uno de los genes *rssB*, *crp* y *cyaA* confería a estas cepas un aumento significativo en la

resistencia a presiones de 300 MPa, sugiriendo que la resistencia a las altas presiones es de naturaleza multifactorial (Vanlint et al., 2013).

Los tratamientos combinados (APH+TO) a los 7 días de almacenamiento fueron capaces de reducir 2,65 y 2,40 log ufc/g la población de aEPEC y STEC, respectivamente (Figura VI.2). Al final de los 28 días no se observó diferencia significativa en la reducción de ambas cepas ( $p>0,05$ ), si bien la cepa de aEPEC alcanzó una reducción media de 4,30 log ufc/g y la de STEC de 4,80 log ufc/g (Figura VI.2). El efecto aditivo de los tratamientos individuales de envasado activo de TO y APH alcanzan los valores de 3,72 (aEPEC) y 3,74 (STEC) log ufc/g (Figura VI.2), cuyo efecto es significativamente menor al observado cuando se aplicaron tratamientos combinados. La reducción de los tratamientos combinados en aEPEC superó en 0,58 log ufc/g la suma de los tratamientos individuales, mientras que en STEC el efecto fue todavía más destacado superando 1,06 log ufc/g en comparación con el efecto aditivo individual. Estos resultados confirman el efecto sinérgico promovido por el uso de los tratamientos de envasado activo de TO y APH. El efecto sinérgico observado puede ser explicado por la acción de ambos tratamientos en la membrana celular de la bacteria (Stratakos et al., 2015), pues el tratamiento de APH provoca daño en la membrana celular que permite que las células bacterianas sean más susceptibles a los efectos de los aceites esenciales de TO. En los últimos años, diversos estudios demostraron la eficacia de la combinación de los tratamientos de APH y aceites esenciales en el control de bacterias patógenas (Evrendilek y Balasubramaniam, 2011; Pérez Pulido et al., 2012; Sanz-Puig et al., 2017; Stratakos et al., 2015).

La comparación de los efectos de los diferentes tratamientos en el daño celular y en la inactivación de las células de aEPEC y STEC a lo largo del tiempo se presenta en la Figura VI.3. En esta figura, se observa que en las muestras control para aEPEC (Figura 3.Ia) y STEC (Figura VI.3.Ib) la refrigeración (7 °C) en atmósfera modificada ( $\text{CO}_2/\text{N}_2$  30/70%) no provoca casi ninguna inactivación ni daño celular en las cepas.

**Figura VI.3.** Distribución de células intactas, dañadas e inactivadas de aEPEC ONT:H2 (a) y STEC O140:H32 (b), en cuñas de queso durante su almacenamiento a refrigeración a 7 °C en atmósfera modificada tras aplicar diversos tratamientos antimicrobianos: (I) control, (II) envase activo de tomillo al 2% (TO), (III) aplicación de altas presiones hidrostáticas (300 MPa-10 min, APH) y (IV) aplicación de APH y envase activo de tomillo al 2%.



\*Tras aplicación de altas presiones hidrostáticas.

En las muestras con envase activo de TO, la reducción de las células intactas y el aumento de células inactivadas es progresivo a lo largo del tiempo, mientras que las células dañadas se mantienen inferiores a 0,65 log ufc/g durante los 28 días para ambas cepas (Figura VI.3.IIa y b).

En los tratamientos de APH, como se ha descrito anteriormente, el comportamiento de las cepas fue distinto. Así, en la cepa de aEPEC (Figura VI.3.IIIa) la reducción de las células intactas y el aumento de células inactivadas fue prácticamente el mismo en el momento del tratamiento y al final del almacenamiento. Sin embargo, el efecto en STEC (Figura VI.3.IIIb) fue aumentado al pasar el tiempo, donde hubo una disminución de las células intactas y un aumento tanto de las células inactivadas como de las dañadas.

Cuando se compara el efecto sub-letal de los tratamientos de APH y TO al final del almacenamiento, el daño celular producido por APH fue 4 veces más grande que el producido por TO para aEPEC y 2 veces mayor para STEC (Figura VI.3.II y III). En el tratamiento combinado, las células inactivadas y las células dañadas aumentaron durante todo el período de almacenamiento, lográndose una desaparición total de las células intactas en STEC (Figura VI.3.IVb) y una casi total (a niveles inferiores a 0,18 log ufc/g) en aEPEC (Figura VI.3.IVa), resultado no alcanzado en los tratamientos individuales.

Los recuentos de BAL bajo los efectos de los tratamientos de envase activo de TO, APH y sus combinaciones a lo largo del tiempo en las muestras de queso se presentan en la Tabla VI.3.

**Tabla VI.3.** Recuento de bacterias ácido lácticas en cuñas de queso almacenado durante 28 días a 7 °C en atmósfera modificada.

Tiempo	<sup>2</sup> Control sin inóculo	<sup>3</sup> Control	<sup>4</sup> TO	<sup>5</sup> APH	<sup>6</sup> APH+TO
0	<sup>1</sup> 8,39±0,04 <sup>a</sup>	8,11±0,04 <sup>a</sup>	8,11±0,04 <sup>a</sup>	8,11±0,04 <sup>a</sup>	8,11±0,04 <sup>a</sup>
Tras APH	-	-	-	7,79±0,08 <sup>b</sup>	7,79±0,08 <sup>b</sup>
7	7,99±0,14 <sup>b</sup>	8,11±0,18 <sup>a</sup>	7,96±0,02 <sup>ab</sup>	7,53±0,15 <sup>b</sup>	7,26±0,09 <sup>c</sup>
14	7,77±0,17 <sup>b</sup>	7,86±0,05 <sup>b</sup>	7,89±0,11 <sup>b</sup>	7,03±0,02 <sup>c</sup>	6,70±0,01 <sup>d</sup>
28	8,15±0,32 <sup>ab</sup>	7,85±0,09 <sup>b</sup>	7,85±0,10 <sup>b</sup>	7,00±0,22 <sup>c</sup>	6,87±0,16 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>Para una misma columna, superíndices con diferentes letras muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los recuentos. Los recuentos (en log ufc/g) son el promedio de cuatro análisis y sus desviaciones estándares.

<sup>2</sup>Cuñas de queso sin inóculo de *E. coli* ni tratamientos antimicrobianos.

<sup>3</sup>Cuñas de queso inoculadas con *E. coli* sin tratamiento adicional previo al envasado en atmósfera modificada.

<sup>4</sup>Cuñas de queso inoculadas con *E. coli*, rodeadas con biopelículas de tomillo al 2% antes de su envasado en atmósfera modificada.

<sup>5</sup>Cuñas de queso inoculadas con *E. coli* y tratadas con altas presiones hidrostáticas (300 MPa durante 10 minutos) antes de su envasado en atmósfera modificada.

<sup>6</sup>Cuñas de queso inoculadas con *E. coli*, tratadas con altas presiones hidrostáticas (300 MPa durante 10 minutos) y rodeadas con biopelículas de aceite esencial de tomillo al 2% antes de su envasado en atmósfera modificada.

Las BAL (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y *Streptococcus thermophilus*) del fermento comercial CHOOZITTM MA 4001 LYO 5 DCU (Danisco, Sassenage, Francia) no fueron afectadas por las biopelículas de tomillo, así su reducción fue la misma que la experimentada por el control al final del almacenamiento (0,26 log ufc/g, Tabla VI.3). Un resultado semejante fue descrito en carne picada de vacuno con películas de 5% de TO (Emiroğlu et al., 2010), que también señalaban que las bacterias ácido-lácticas (en ese caso, *Lactobacillus plantarum*) fueron más resistentes a las películas *in vitro* que *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El tratamiento de APH alcanzó una reducción de la población de BAL de 1,11 log ufc/g, mientras que en el tratamiento combinado redujo dicha población 1,24 log ufc/g. Aunque el tratamiento combinado afectó en mayor medida a las BAL en comparación con los tratamientos individuales, se observa que el efecto no fue tan intenso como el producido sobre las cepas de *E. coli*, no apreciándose tampoco la sinergia entre tratamientos pues la reducción obtenida con su combinación no superó la suma de los tratamientos individuales que fue de 1,37 log ufc/g (Tabla VI.3).

#### **4. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES**

Las cepas de aEPEC y STEC inoculadas en quesos madurados a base de leche cruda de vaca y almacenados a refrigeración (7 °C) en atmósfera modificada (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 30/70%) no sufrieron inactivación ni daño celular durante 28 días. Los tratamientos no térmicos de envasado activo de tomillo (TO) y de altas presiones hidrostáticas (APH) ejercieron individualmente actividad antimicrobiana cuando fueron aplicados en queso envasado en atmósfera modificada y almacenado a refrigeración, reduciendo de forma importante las poblaciones de aEPEC y STEC. Además, cuando fueron combinados mostraron un efecto sinérgico.

La aplicación de envases activos de TO y APH, individualmente o en combinación, en queso madurado a base de leche cruda de vaca envasado en atmósfera modificada y almacenado a refrigeración, afecta solo ligeramente a la multiplicación o a la supervivencia de las bacterias ácido-lácticas propias del queso madurado.

Así pues, la combinación de envases activos de TO y APH muestra potencial interés para formar parte de sistemas de conservación alternativos a los métodos tradicionales que se utilizan en la industria quesera.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Nehlawi, A., Guri, S., Guamis, B., Saldo, J., 2014. Synergistic effect of carbon dioxide atmospheres and high hydrostatic pressure to reduce spoilage bacteria on poultry sausages. *LWT - Food Sci. Technol.* 58, 404–411. doi:10.1016/j.lwt.2014.03.041
- Álvarez-Suárez, M.-E., Otero, A., García-López, M.-L., Dahbi, G., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J., Santos, J.A., 2016. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *Int. J. Food Microbiol.* 236, 148–154. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.035
- Arvanitoyannis, I.S., Kargaki, G.K., Hadjichristodoulou, C., 2011. Effect of three MAP compositions on the physical and microbiological properties of a low fat Greek cheese known as “Anthotyros.” *Anaerobe* 17, 295–297. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.04.007
- Assiri, A.M.A., Elbanna, K., Abulreesh, H.H., Ramadan, M.F., 2016. Bioactive compounds of cold-pressed thyme (*Thymus vulgaris*) oil with antioxidant and antimicrobial properties. *J. Oleo Sci.* 65, 629–640. doi:10.5650/jos.ess16042
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T., Mackey, B., 1999. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1564–1569.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- D'Costa, D., Bhosle, S.N., Dhuri, R.B., Doijad, S.P., Poharkar, K. V., Kalorey, D.R., Barbuddhe, S.B., 2013. Prevalence, serogroups, Shiga-toxin genes and pulsed field gel electrophoresis analyses of *Escherichia coli* isolated from bovine milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 83, 423–429. doi:10.1007/s40011-012-0145-7
- De Lamo-Castellví, S., Capellas, M., Roig-Sagués, A.X., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M.M., Guamis, B., 2006. Fate of *Escherichia coli* strains inoculated in model cheese elaborated with or without starter and treated by high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* 69, 2856–2864.
- EFSA, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14, 1–231. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- Emiroğlu, Z.K., Yemiş, G.P., Coşkun, B.K., Candoğan, K., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci.* 86, 283–288. doi:10.1016/j.meatsci.2010.04.016

## Capítulo VI. Control de STEC y aEPEC en queso mediante tratamientos combinados

- Evrendilek, G.A., Balasubramaniam, V.M., 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. *Food Control* 22, 1435–1441. doi:10.1016/j.foodcont.2011.03.005
- Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., Chatzopoulou, P.S., 2011. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Feta cheese packaged under modified atmosphere. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 1240–1244. doi:10.1016/j.lwt.2010.09.022
- Hsu, H., Sheen, S., Sites, J., Cassidy, J., Scullen, B., Sommers, C., 2015. Effect of high pressure processing on the survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (Big Six vs. O157:H7) in ground beef. *Food Microbiol.* 48, 1–7. doi:10.1016/j.fm.2014.12.002
- Kapetanakou, A.E., Skandamis, P.N., 2016. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: natural volatile antimicrobial compounds. *Curr. Opin. Food Sci.* 12, 1–12. doi:10.1016/j.cofs.2016.06.001
- Kasrazadeh, M., Genigeorgis, C., 1995. Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 289–300.
- Kolenda, R., Burdukiewicz, M., Schierack, P., 2015. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1–12. doi:10.3389/fcimb.2015.00023
- 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 cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2035–2041. doi:10.1128/AEM.02089-10
- Marozzi, S., De Santis, P., Lovari, S., Condoleo, R., Bilei, S., Marcianò, R., Mezher, Z., 2016. Prevalence and molecular characterisation of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk cheeses from Lazio region, Italy. *Ital. J. Food Saf.* 5, 4–6. doi:10.4081/ijfs.2016.4566
- Martínez-Rodríguez, Y., Acosta-Muñiz, C., Olivas, G.I., Guerrero-Beltrán, J., Rodrigo-Aliaga, D., Sepúlveda, D.R., 2012. High hydrostatic pressure processing of cheese. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 399–416. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00192.x
- Mohammadi, P., Abiri, R., 2013. Isolation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from raw milk in Kermanshah by polymerase chain reaction (PCR). *Jundishapur J. Microbiol.* 6, 1–4. doi:10.5812/jjm.5439
- Morris, C., Brody, A.L., Wicker, L., 2007. Non-thermal food processing/preservation technologies: a review with packaging implications. *Packag. Technol. Sci.* 20, 275–286. doi:10.1002/pts.789

- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5864–5869. doi:10.1128/AEM.01809-13
- Pérez Pulido, R., Toledo del Árbol, J., Grande Burgos, M.J., Gálvez, A., 2012. Bactericidal effects of high hydrostatic pressure treatment singly or in combination with natural antimicrobials on *Staphylococcus aureus* in rice pudding. *Food Control* 28, 19–24. doi:10.1016/j.foodcont.2012.04.045
- Reineke, K., Sevenich, R., Hertwig, C., Janßen, T., Fröhling, A., Knorr, D., Wieler, L.H., Schlüter, O., 2015. Comparative study on the high pressure inactivation behavior of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 and O157:H7 outbreak strains and a non-pathogenic surrogate. *Food Microbiol.* 46, 184–194. doi:10.1016/j.fm.2014.07.017
- Robey, M., Benito, A., Hutson, R.H., Pascual, C., Park, S.F., Mackey, B.M., 2001. Variation in resistance to high hydrostatic pressure and *rpoS* heterogeneity in natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4901–4907. doi:10.1128/AEM.67.10.4901
- Sanz-Puig, M., Moreno, P., Pina-Pérez, M.C., Rodrigo, D., Martínez, A., 2017. Combined effect of high hydrostatic pressure (HHP) and antimicrobial from agro-industrial by-products against *S. Typhimurium*. *LWT - Food Sci. Technol.* 77, 126–133. doi:10.1016/j.lwt.2016.11.031
- Smith, J.L., Fratamico, P.M., Launchi, N.R., 2015. Update on non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* as a foodborne pathogen: analysis and control, in: Sofos, J. (Ed.), *Advances in Microbial Food Safety*. Elsevier, Cambridge, pp. 3–32. doi:10.1533/9781782421153.1.3
- Soliva-Fortuny, R., Grigelmo-Miguel, N., Barbosa-Cánovas, G. V., Martín-Belloso, O., 2011. Nonthermal processes as hurdles with selected examples, in: Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G. V., Balasubramaniam, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D.F., Yuan, J.T.C. (Eds.), *Nonthermal Processing Technologies for Food*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 406–427. doi:10.1002/9780470958360.ch28
- Stoica, M., Mihalcea, L., Borda, D., Alexe, P., 2013. Non-thermal novel food processing technologies . An overview. *J. Agroaliment. Process. Technol.* 19, 212–217.
- Stratakos, A.C., Delgado-Pando, G., Linton, M., Patterson, M.F., Koidis, A., 2015. Synergism between high-pressure processing and active packaging against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken breast. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 41–47. doi:10.1016/j.ifset.2014.11.005

## Capítulo VI. Control de STEC y aEPEC en queso mediante tratamientos combinados

- Tao, Y., Sun, D.-W., Hogan, E., Kelly, A.L., 2014. High-pressure processing of foods, in: Sun, D.-W. (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier, Oxford, pp. 3–24. doi:10.1016/B978-0-12-411479-1.00001-2
- Trevisani, M., Mancusi, R., Riu, R., Serraino, A., 2013. Quantitative detection of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* O157 and O26 in bulk raw milk. *Food Anal. Methods* 6, 1750–1758. doi:10.1007/s12161-013-9691-8
- Vanlint, D., Pype, B.J.Y., Rutten, N., Vanoirbeek, K.G.A., Michiels, C.W., Aertsen, A., 2013. Loss of cAMP/CRP regulation confers extreme high hydrostatic pressure resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 65–71. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.020
- Villa, T.G., Veiga-Crespo, P., 2014. *Antimicrobial Compounds*. Springer, Berlin. doi:10.1007/978-3-642-40444-3





**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

**1<sup>a</sup>.** El riesgo asociado a la presencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) no-O157 y *E. coli* enteropatogénico (EPEC) atípico en queso madurado a base de leche cruda de vaca parece bajo (no detección en más de 100 muestras), aunque la leche cruda de vaca y el ambiente de las explotaciones de ganado vacuno son una fuente significativa de estas bacterias. Así, la incidencia de genes *stx* en leche de vaca procedente de Castilla y León es elevada (superior al 27%), aunque el aislamiento de cepas de STEC es menos frecuente (alrededor del 2%) y se produce principalmente en el invierno. Sin embargo, la incidencia de cepas de EPEC atípicas en leche de vaca es relativamente alta (superior al 6%) y se produce mayoritariamente en verano.

**2<sup>a</sup>.** A pesar de que el subtipo *stx1a* predomina entre las cepas de STEC no-O157 aisladas de leche de vaca producida en Castilla y León y su hábitat próximo (operarios, aire, pienso y heces), todas las cepas de STEC positivas al gen *stx2* pertenecen a los subtipos *stx2a* o *stx2d*, algunas se adscriben a serotipos de importancia clínica (O91:H21 y O55:H8) y son portadoras de multirresistencias, tres características que se asocian frecuentemente con enfermedades graves en las personas. El perfil alélico 10, que se considera que incluye cepas de gran importancia sanitaria, predomina entre las cepas de STEC no-O157 aisladas de leche de vaca y su hábitat próximo (operarios y heces de los animales), incluye mayoritariamente cepas del serotipo O140:H32 y se aísla de más de una explotación, lo que confirma posibles vías comunes de contaminación (operarios y heces) de la leche de vaca con STEC. Los resultados obtenidos proporcionan evidencia adicional de que la leche de vaca y el ambiente de las explotaciones ganaderas son fuentes potenciales de STEC no-O157 que portan genes de virulencia y múltiples resistencias antibióticas, que podrían comprometer la salud pública por su potencial capacidad de infección humana y a través de la diseminación de resistencias antimicrobianas.

## CONCLUSIONES

**3<sup>a</sup>.** Casi la tercera parte de las cepas EPEC atípicas aisladas de la leche de vaca y su hábitat son resistentes al menos a una de las 22 sustancias antimicrobianas estudiadas. La mitad de estas cepas comparten un patrón de multiresistencia que incluye aminoglucósidos, tetraciclinas, cefalosporinas y sulfonamidas. Dos de estas cepas multirresistentes aisladas de heces configuran el perfil alélico 17 que forma parte de un complejo clonal compartido con cepas contaminantes de la leche de vaca. Así pues, la leche de vaca y las heces del entorno de las explotaciones vacunas, son fuentes de EPEC atípicas portadoras de resistencias antimicrobianas que podrían transmitirse a lo largo de la cadena alimentaria.

**4<sup>a</sup>.** Las cepas EPEC atípicas obtenidas del hábitat vacuno presentan una gran diversidad genética a partir del análisis de macrorrestricción del ADN bacteriano (PFGE) y de los polimorfismos en los siete genes *housekeeping* por MLST. La estrecha relación genética entre las cepas de EPEC atípicas obtenidas de leche de vaca y de heces, pertenecientes al complejo clonal formado por el ST 20 y el ST 17, con amplia distribución geográfica entre las explotaciones vacunas, agrupadas en el pulsotipo C', y que comparten genes de virulencia y mayoritariamente el antígeno H2, avala la tesis de que las heces presentes en las camas del ganado vacuno son un vehículo principal de contaminación de la leche por este tipo enteropatógeno emergente.

**5<sup>a</sup>.** Los procesos convencionales de elaboración y maduración del queso a partir de leche cruda de vaca no garantizan la inactivación de cepas STEC no-O157 y EPEC atípicas cuando la contaminación de la leche ocurre a niveles altos ( $10^3$  ufc/ml) de dichas bacterias, puesto que se siguen detectando significativamente en el queso después de 90 días de maduración, especialmente EPEC atípica cuyo grado de inhibición no supera 1,4 reducciones decimales.

## CONCLUSIONES

**6<sup>a</sup>.** Las bajas concentraciones bacteriostáticas y bactericidas de las biopelículas de aceite esencial de tomillo *in vitro* frente a cepas de STEC no-O157 y EPEC atípicas, procedentes de leche de vaca y con gran capacidad potencial de multiplicación en condiciones de acidez y presencia de sal, ponen de manifiesto su potencial aplicabilidad. Los tratamientos no térmicos de envasado activo con extractos de tomillo y altas presiones hidrostáticas poseen individualmente actividad antimicrobiana frente a cepas de estos grupos patógenos cuando se aplican en queso envasado en atmósfera modificada y almacenado a refrigeración, reduciendo de forma importante sus poblaciones microbianas. Además, cuando se aplican combinados ejercen un efecto sinérgico. Así pues, la combinación de envasado activo con tomillo y altas presiones hidrostáticas muestra potencial interés para formar parte de sistemas de conservación alternativos a los métodos tradicionales que se utilizan en la industria quesera.

