



Universidad de León
Facultad de Veterinaria

Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

**“Incidencia, Comportamiento y
Control de Tipos Patógenos de
Escherichia coli (STEC y EPEC) en
Leche y Queso de Oveja”**



Verónica Otero Álvarez

León, 2014



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La Dra. Dña. María Luisa García López y el Dr. D. José María Rodríguez Calleja como Directores de la Tesis Doctoral titulada “**Incidencia, Comportamiento y Control de Tipos Patógenos de Escherichia coli (STEC y EPEC) en Leche y Queso de Oveja**” realizada por Dña. Verónica Otero Álvarez en el programa de doctorado “Estrategias para la mejora y control de la calidad de los alimentos de origen animal”, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a de de 2014

Fdo. María Luisa García López

Fdo. José María Rodríguez Calleja



ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El Consejo del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, órgano responsable del programa de doctorado “Estrategias para la mejora y control de la calidad de los alimentos de origen animal” en su reunión celebrada el día de de 2014 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “**Incidencia, Comportamiento y Control de Tipos Patógenos de Escherichia coli (STEC y EPEC) en Leche y Queso de Oveja**”, dirigida por la Dra. Dña. María Luisa García López y el Dr. D. José María Rodríguez Calleja, elaborada por Dña. Verónica Otero Álvarez, y cuyo título en inglés es el siguiente “**Incidence, Behaviour and Control of Pathogenic Types of Escherichia coli (STEC and EPEC) in Ewes’ Milk and Cheese**”.

Lo que firmo, en León a de de 2014.

El Secretario,

Fdo.: Bernardo Prieto Gutiérrez

Vº Bº

El Director del Departamento

Fdo.: Andrés Otero Carballeira

FINANCIACIÓN

Para llevar a cabo esta Tesis Doctoral, la doctoranda fue beneficiaria de una Ayuda del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación Cultura y Deporte.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Castilla y León (Ayuda Grupo de Excelencia GR-155 y proyecto LE331A12_2) y por el proyecto AGL2011-26118/ALI del Plan Nacional de Investigación (Ministerio de Economía y Competitividad).

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores, Dra. María Luisa García López y Dr. José María Rodríguez Calleja, por su tutela y apoyo, tanto profesional como personal, a lo largo de estos años.

A todos los miembros del Departamento de Higiene y Tecnología de los alimentos que de un modo u otro han colaborado en la elaboración de esta tesis. A los Doctores Jesús Ángel Santos Buerga y Andrés Otero Carballeira por su colaboración en el desarrollo de este trabajo. A Aurelia, Rosa, Dolores y Araceli por su gran apoyo en muchos momentos. Y especialmente a Elena, Elsa y Luisa, por todo.

Al Dr. Carlos Gonzalo Abascal y el Consorcio de Promoción del Ovino, porque sin su personal y ganadería este trabajo no podría haberse llevado a cabo.

A la Dra. Antonia Remacha del Hospital de León por su colaboración en este trabajo.

A la Dra. Cristina Nerín y todo su equipo (Instituto de investigación en ingeniería de Aragón), por permitirme trabajar con ellos durante un tiempo que resultó muy provechoso.

A todo el personal de la Unidad de Enterobacterias, Campylobacter y Vibrio del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, especialmente a los Doctores Silvia Herrera León y Sergio Sánchez Prieto por hacer que me sintiera como en casa y por su ayuda, tanto durante la estancia como posteriormente, transmitiéndome sus conocimientos y resolviendo las dudas que fueron surgiendo.

A mi familia, especialmente a mis padres y mi tía, porque siempre han hecho todo lo que estaba en su mano para que yo pudiera llegar hasta aquí, sin ellos no sería quien soy.

A Jesús, por apoyarme durante tantos años y ayudarme a superar los momentos más duros de este proyecto de “ecolí”, este camino ha sido más fácil gracias a él.

A mis amigas, por estar siempre.

“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no te dejen lugar a dudas”

Louis Pasteur

A mi familia



ÍNDICE

- INTRODUCCIÓN GENERAL. Antecedentes, Justificación y Objetivos.....1
- CAPÍTULO I: Incidencia de toxinas Shiga (Stxs), de genes *stxs* y de dos tipos patógenos de *Escherichia coli* (STEC y EPEC) en leche de oveja y otras muestras de origen ovino procedentes de explotaciones de Castilla y León.....53
- CAPÍTULO II: Caracterización y estudio comparativo de cepas de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC) aisladas de leche de oveja, de sus explotaciones y de pacientes.....85
- CAPÍTULO III: Caracterización y estudio comparativo de cepas de *Escherichia coli* enteropatogénico (EPEC) procedentes de leche de oveja, muestras ambientales y de pacientes.....149
- CAPÍTULO IV: Comportamiento de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) en leche de oveja almacenada a diferentes temperaturas y durante la elaboración y maduración de queso tipo Zamorano.....171
- CAPÍTULO V: Evaluación de dos películas activas para el control de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 en queso madurado de oveja (Zamorano).....203
- CONCLUSIONES.....235
- ANEXOS.....239
 - 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.
 - Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano).
 - Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bulk tank ewes' milk and sheep farm environment.



INTRODUCCIÓN GENERAL.
Antecedentes, Justificación y Objetivos

1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA LECHE DE OVEJA

1.1. Composición química de la leche de oveja

La leche es 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 o a elaboración ulterior”* (Codex Alimentarius, 1999). En cuanto a su composición, existen diferencias tanto inter como intra especies. La composición y calidad higiénica de la leche varían en función de la raza, el individuo, la estación del año, la alimentación, el manejo, las condiciones ambientales, la región, la fase de lactación y el estado sanitario del animal lechero. La leche de ovino contiene mayor cantidad de sólidos totales y mayor cantidad de nutrientes que la de caprino o vacuno (Tabla 0.1) (Park et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2008).

Las características diferenciales de la leche de oveja respecto a la de otras especies son las siguientes (Tabla 0.1) (Park et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2008):

El carbohidrato mayoritario presente en la leche es la lactosa, representando el 49% de los carbohidratos de la leche de oveja. El contenido en lactosa en leche de oveja es similar al presente en leche de vaca, mientras que los niveles de grasa y proteína son mucho mayores. Por esto, la lactosa en leche de oveja representa una proporción de los sólidos totales menor comparándola con la leche de vaca (22-27% y 33-40%, respectivamente). Otros carbohidratos que se encuentran en leche de ovino son oligosacáridos, glucopéptidos, glucoproteínas y otros en menor proporción.

Tabla 0.1. Composición media de nutrientes básicos de las leches de cabra, oveja, vaca y humano (Park et al., 2007).

Composición	Cabra	Oveja	Vaca	Humana
Grasa (%)	3,8	7,9	3,6	4,0
Sólidos no grasos (%)	8,9	12,0	9,0	8,9
Lactosa (%)	4,1	4,9	4,7	6,9
Proteína (%)	3,4	6,2	3,2	1,2
Caseína (%)	2,4	4,2	2,6	0,4
Albúmina, globulina (%)	0,6	1,0	0,6	0,7
N. no proteico (%)	0,4	0,8	0,2	0,5
Cenizas (%)	0,8	0,9	0,7	0,3
Calorías/100 ml	70	105	69	68

Los lípidos son el componente más importante en cuanto al valor económico y las características nutritivas, físicas y sensoriales de los productos lácteos, además del más variable cuantitativa y cualitativamente en función de la fase de lactación, estación, raza, genotipo y alimentación. El grupo de lípidos mayoritario (en torno al 98%) son los triacilgliceroles (TAG). Además de TAG, la leche de ovino presenta otros lípidos simples (diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ésteres de colesterol), lípidos complejos (fosfolípidos) y compuestos liposolubles (esteroles, hidrocarburos).

Los productos lácteos son fuente de proteínas de alta calidad biológica. El contenido en proteínas de la leche de oveja es superior al de otras especies (Tabla 0.1) aunque varía mucho, estando relacionado con la raza, la fase de lactación, la alimentación, el clima, la estación del año y el estado sanitario del animal. Su elevado porcentaje de nitrógeno proteico es responsable de la gran capacidad de coagulación de la leche de oveja. Las proteínas de la leche se clasifican en caseínas, proteínas del suero y proteínas menores.

La concentración de minerales en la leche no fluctúa demasiado, aunque puede variar ligeramente debido a la raza, dieta, individuo, fase de lactación y estado sanitario. En la leche de oveja, un 0,9% de sus cenizas son minerales (frente a un 0,7% en vacuno), siendo los niveles de Ca, P, Mg, Zn, Fe y Cu mayores que en leche de vaca mientras que ocurre lo contrario con los niveles de K, Na y Mn.

En general, la leche de oveja contiene niveles más altos de vitaminas que la de los animales pertenecientes a las especies bovina y caprina, siendo una excepción el contenido en carotenos.

1. 2. Fuentes de contaminación microbiana de la leche de oveja

Los niveles de microorganismos en la leche proporcionan información acerca del estado sanitario del animal lechero y sobre la higiene tanto del ordeño como de las fases posteriores. De hecho, en muchos países se ha conseguido un descenso de los recuentos, desde $\geq 10^6$ ufc/ml hasta $< 2 \times 10^4$ ufc/ml, como resultado de aplicar correctos programas de higiene (ICMSF, 2005). En la Unión Europea (UE), el límite microbiológico para la leche cruda de oveja es de $1,5 \times 10^6$ ufc/ml aunque si está destinada a la fabricación de productos lácteos sin previo tratamiento térmico, el límite es de 5×10^5 ufc/ml tal y como recoge en el Reglamento (CE) Nº 853/2004 (Anónimo, 2004). También se puede utilizar como índice de higiene de la leche de tanque el recuento de células somáticas. Este, en el caso de animales sanos, se encuentra por debajo de 100.000 células/ml de leche (ICMSF, 2005).

El número y el tipo de microorganismos presentes en la leche se ven directamente afectados por la acción de sustancias antimicrobianas presentes de forma natural y otros compuestos inhibidores exógenos como los antimicrobianos utilizados en sanidad animal. Las fuentes de contaminación de la leche incluyen (ICMSF, 2005):

1.2.1. Interior de la ubre

En animales sanos el tejido secretor de la ubre se encuentra libre de microorganismos, aunque la mucosa del canal del pezón contiene microorganismos que pueden pasar a la leche como estreptococos, estafilococos y micrococos (<50%) además de *Corynebacterium* spp., coliformes, bacterias acidolácticas y otras bacterias. El nivel de contaminación a través de este canal varía entre 10^2 y 10^4 ufc/ml de leche.

La infección de la ubre también influye en la microbiología de la leche. Estas infecciones pueden detectarse en caso de que se trate de mamitis clínicas, pero existen mamitis subclínicas que no producen síntomas y por tanto más difíciles de

Introducción general

detectar. Las mastitis dan lugar a un aumento de microorganismos (variable en función la importancia de la afección) y de los recuentos de células somáticas en la leche. Entre los microorganismos más frecuentemente asociados a mastitis subclínicas podemos encontrar: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, estafilococos coagulasa negativos, *Mycoplasma*, coliformes, *Escherichia coli*, *Corynebacterium bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y levaduras. Estos microorganismos son importantes porque dan lugar a cambios en la composición de la leche, algunos son patógenos para el hombre y, además, se pueden encontrar en leche residuos de los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de mastitis.

Los ruminantes pueden infectarse también con patógenos agentes de zoonosis que llegan a la leche como *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. o *Coxiella burnetii*.

1.2.2. Superficie de la ubre y pezón

Puede producirse contaminación durante el ordeño si la previa limpieza y desinfección de la ubre no se realiza de forma adecuada, aportando a la leche microorganismos en niveles que van de 100 a 1.000 ufc/ml.

Esporulados como *Bacillus* spp. o clostridios procedentes de la tierra, pienso o de las heces llegan a la leche a través de esta vía. Aunque bacterias como *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. o *E. coli* enteropatógenos pueden provocar mastitis, normalmente su presencia en leche se debe a contaminación a partir de las heces de animales infectados o portadores.

1.2.3. Equipos y utensilios

La limpieza y desinfección de los equipos utilizados en el ordeño, transporte y almacenamiento es esencial para el mantenimiento de la calidad higiénica de la leche. Pueden llegar a la leche a través de esta vía bacterias psicrótrofas Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* y *Chromobacterium* spp. o termófilas que fácilmente colonizan las superficies de los materiales en contacto con la leche.

Introducción general

Periodos prolongados de tiempo sin limpieza y desinfección adecuada de los equipos y medios de almacenamiento y transporte puede dar lugar a la formación de “biofilms”. Los recuentos totales en estos “biofilms” se encuentran entre 10^3 - 10^{11} ufc/g y normalmente están constituidos por estreptococos (5 – 20%), micrococos (20 – 50%), corinebacterias (10 – 16%), coliformes (0,8 – 30%), otras bacterias Gram-negativas (11 – 27%) y microorganismos aerobios formadores de esporas (0,5 – 3,6%). Muchas de estas bacterias son termorresistentes y pueden dar problemas durante el procesado de la leche.

1.2.4. Ambiente

Esta contaminación ambiental puede ser principalmente a través del aire o del agua. En el caso del aire los microorganismos que predominan suelen ser micrococos, levaduras, esporas de *Bacillus* y *Clostridium* spp. y mohos. Los suministros de agua de las explotaciones a menudo contienen coliformes y organismos psicrotrofos, y cuando se utiliza en el aclarado de los equipos puede ser fuente de contaminación de la leche, por lo que este agua debe ser potable.

1.2.5. Personal

Personas enfermas y/o con hábitos higiénicos deficientes constituyen una fuente de transmisión de microorganismos tanto a la leche, como entre los animales del propio rebaño (mamitis).

1.3. Importancia de la leche de oveja

Según datos de la FAO (Food and Agriculture Organization), en el año 2012 había 1.169.004.916 cabezas de ovino en el mundo y 16.813.700 en España. Un total de 217.067.251 del censo mundial y 2.850.000 del español correspondían a cabezas de ganado ovino destinadas a la producción de leche (FAOSTAT, 2012).

A nivel nacional, según datos del “Anuario de estadística 2012” del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), Castilla y León, con 3.259.186 cabezas, ocupaba el primer lugar entre las comunidades autónomas según su censo ovino, seguida de cerca por Extremadura (MAGRAMA, 2012).

En cuanto a producción de leche de ovino, España ocupaba en 2012 el séptimo puesto a nivel mundial con 552.517 toneladas (FAOSTAT, 2012). Por comunidades autónomas, Castilla y León presentaba la mayor producción en 2012 con 366.537.000 litros (el 66% de la producción nacional) (MAGRAMA, 2012).

2. IMPORTANCIA DEL QUESO DE LECHE DE OVEJA

La norma general del Codex Alimentarius para el queso (Codex Alimentarius, 1978) lo define como *“el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante: (a) coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o (b) técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la leche y/o de los productos obtenidos de la leche que dan lugar a un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado (a).”* Esta misma norma establece una clasificación en función del contenido en humedad y las características de maduración tal y como refleja la Tabla 0.2.

Tabla 0.2. Denominación del queso según sus características de consistencia y maduración (Codex Alimentarius, 1978).

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

^a HSMG %: porcentaje de humedad sin materia grasa.

El queso en Castilla y León tiene un potencial productor de más de 90.000 toneladas, lo que supone en torno al 40% del total nacional, convirtiéndola en la primera Comunidad productora de España. La elevada producción quesera de esta Comunidad configura un sector industrial muy relevante en la economía autonómica, a través de un entramado de más de un centenar de industrias lácteas transformadoras y miles de empleados. El sector productor y las industrias lácteas regionales ocupan un lugar muy destacado en el panorama nacional, y el 15% de la facturación final de la industria agroalimentaria regional, solo por detrás del sector cárnico (MAGRAMA, 2011).

Según datos de la FAO, en el año 2012 España ocupaba el tercer puesto en el mundo como productor de queso de oveja con 62.328 toneladas y el segundo en la Unión Europea sólo por detrás de Grecia (FAOSTAT, 2012). La Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León estima que casi 3 de cada 4 quesos de oveja españoles han sido producidos en Castilla y León. La mayor parte de la producción ovina lechera de Castilla y León se dedica a la fabricación de queso madurado elaborado con leche cruda, destacando la Denominación de Origen Protegida (DOP) Queso Zamorano y algunos tipos incluidos en la Marca Colectiva “Queso Castellano”.

3. GRUPOS PATÓGENOS DE *Escherichia coli*

3.1. Características generales de *E. coli*

El género *Escherichia*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está formado por 7 especies, siendo *Escherichia coli* la especie tipo (<http://www.bacterio.cict.fr/e/escherichia.html#r>, última visita 24 de Marzo de 2014).

Introducción general

Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1885 a partir de las heces de un niño por el pediatra austriaco Theodor Escherich (Welch, 2006).

E. coli es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa y generalmente móvil gracias a la presencia de flagelos peritricos. Sus medidas aproximadas son 2 μm de largo y 0,5 μm de ancho. La mayoría de las cepas pertenecientes a esta especie crecen en un amplio rango de temperatura (10-46°C) (Erickson & Doyle, 2007; Farrokh et al., 2013) aunque la óptima oscila entre 37 y 42°C. Respecto al pH, se multiplica a valores de 5,5-8,0, aunque existen ciertas cepas que soportan un pH tan bajo como 2,0-3,0 (Welch, 2006; Farrokh et al., 2013). Es capaz de reducir los nitratos a nitritos y cuando crece en presencia de glucosa u otros carbohidratos produce ácido y gas. Por lo general son oxidasa, citrato, ureasa y SH₂ negativos pero positivos para la producción de indol y la prueba del rojo de metilo. Además, la mayor parte de cepas de *E. coli* tienen capacidad para fermentar la lactosa y otros azúcares como D-manitol, D-sorbitol, L-arabinosa, maltosa, D-xilosa, trehalosa y D-manosa (Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

E. coli se encuentra normalmente en el tracto intestinal del hombre y otros vertebrados. Rara vez da lugar a enfermedad excepto en individuos inmunocomprometidos o con enfermedades que dañan la barrera gastrointestinal (por ejemplo peritonitis), sin embargo existen grupos de cepas que han adquirido genes de virulencia específicos, lo que les ha permitido adaptarse a nuevos nichos y producir un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales. Las cepas de los grupos patógenos de *E. coli* suelen presentar características fenotípicas diferentes a las que muestra la cepa tipo de esta especie. Un ejemplo de ello es *E. coli* O157:H7 que, a diferencia de la mayor parte de cepas de *E. coli*, generalmente no tiene capacidad para fermentar el sorbitol. Otra característica bioquímica que distingue este serotipo es la incapacidad de producir β -D-glucuronidasa. Finalmente, un alto porcentaje de estas cepas presenta un tipo de hemólisis diferente a la α -hemólisis asociada con *E. coli* (Paton & Paton, 1998a; Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Gyles, 2007; Pennington, 2010; Elizaquível et al., 2011).

E. coli se caracteriza rutinariamente por la serotipificación, basándose en la determinación de los antígenos O (somáticos), K (capsulares) y H (flagelares). Hasta ahora se han reconocido más de 700 serotipos de *E. coli*. Algunos serogrupos y serotipos se asocian con determinados síndromes clínicos, pero la identificación de cepas patógenas depende de la detección de determinados factores de virulencia que se encuentran frecuentemente alojados en elementos genéticos móviles que pueden pasar de unas cepas a otras dando lugar a nuevas combinaciones de factores de virulencia (Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

3.2. Características de los grupos patógenos de *E. coli*

Las cepas patógenas de *E. coli* pueden dar lugar a enfermedades tanto intestinales como extraintestinales, concretamente existen tres tipos de infecciones: Infecciones del Tracto Urinario (UTI), meningitis neonatal y gastroenteritis. En el caso de los patógenos intestinales, existen seis grupos patógenos o patotipos (Figura 0.1): *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) y *E. coli* difusoadherente (DAEC) (Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

3.2.1. ETEC:

Frecuentemente produce diarrea acuosa en humanos y animales que puede ser desde leve hasta severa, dando lugar a síntomas similares a los del cólera, produciendo deshidratación e incluso pudiendo provocar la muerte. Este patotipo produce diarrea en niños de países en vías de desarrollo, siendo también una de las causas de la diarrea del viajero. El principal factor de virulencia de ETEC es la producción de dos enterotoxinas, la enterotoxina termolábil (heat-labile enterotoxin –LT-) relacionada con la toxina de *Vibrio cholerae*, y la enterotoxina termoestable (heat-stable enterotoxin –ST-) (Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

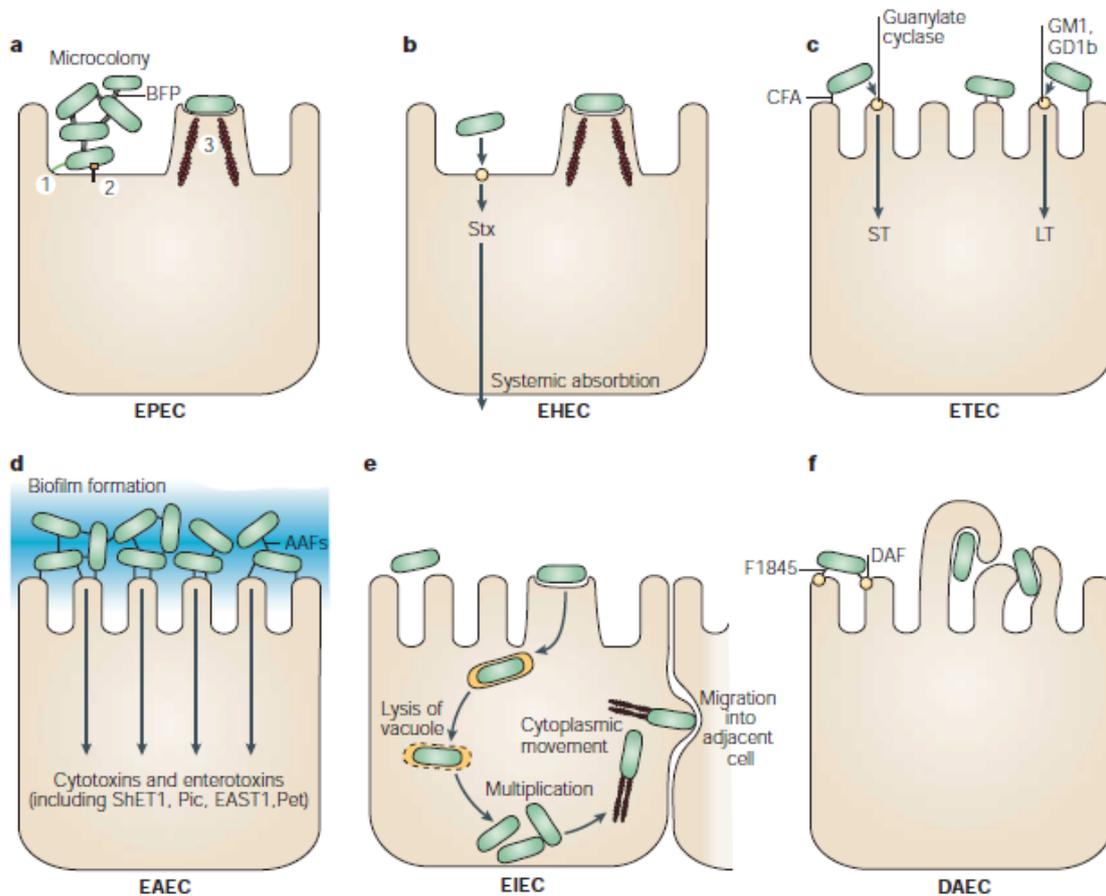


Figura 0.1. Esquema del comportamiento de los seis grupos de *E. coli* diarreagénicos (Kaper et al., 2004).

3.2.2. EAEC:

El grupo EAEC se define como el constituido por cepas de *E. coli* que no producen LT o ST y que se adhieren a las células HEp-2 con un patrón conocido como enteroagregativo, en el que las bacterias se adhieren unas a otras en una configuración de “ladrillos apilados”. Este patotipo es responsable de diarrea acuosa que en ocasiones se presenta acompañada de dolor abdominal pero no fiebre. Las células no pasan al torrente circulatorio y son causa de diarrea persistente en niños y adultos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo.

3.2.3. EIEC:

Este patotipo se encuentra muy relacionado tanto patogénicamente como fenotípicamente con *Shigella*, compartiendo los principales genes de virulencia de esta

bacteria. EIEC produce colitis inflamatoria invasiva y disentería con presencia de mucus y sangre en las heces, fiebre y dolor severo igual que en el caso de *Shigella*, aunque en la mayor parte de los casos únicamente da lugar a diarrea acuosa. Los genes asociados a su patogénesis se encuentran en un plásmido (Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

3.2.4. DAEC:

DAEC puede dar lugar a diarrea en niños menores de un año y se diferencia de otros *E. coli* diarreagénicos por su inconfundible fenotipo de adhesión a células Hep-2. Esta adhesión es provocada por la fimbria F1845, perteneciente a la familia Dr de adhesinas, que reconoce y se une al DAF (decay-accelerating factor), factor que normalmente protege a las células de posibles daños (Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

3.2.5. EPEC:

Este patotipo de *E. coli* se define como “cepas productoras de diarrea que originan lesiones intestinales de adhesión y borrado (A/E) pero que no poseen los genes que codifican para las toxinas Shiga (verotoxinas)”. Es una de las principales causas de diarrea en niños en países en vías de desarrollo mientras que en países desarrollados su frecuencia ha disminuido (aunque siguen siendo una causa importante de diarrea). Se multiplican en el intestino delgado provocando diarrea acuosa que puede contener mucus pero no sangre. También pueden presentarse otros síntomas como vómitos, fiebre, malestar y deshidratación. Los síntomas suelen durar unos días, aunque se han descrito casos crónicos (Trabulsi et al., 2002; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

Los genes responsables de las lesiones de adhesión-borrado se encuentran en una isla de patogenicidad de 35 kb denominada “locus of enterocyte effacement” (LEE). En esta isla de patogenicidad se hallan los genes que codifican para la proteína externa de membrana (intimina –*eae*-), los genes *esp* (*E. coli* secreted proteins a, b y d), el gen que codifica para el receptor traslocado de intimina Tir (translocated intimin

receptor) y los genes para la síntesis del sistema de secreción tipo III (Trabulsi et al., 2002; Kaper et al., 2004).

Se distinguen dos tipos de EPEC en función de la presencia o no de un plásmido de 70-100 kb, el plásmido “EPEC adherence factor” (EAF). Las denominadas EPEC típicas (tEPEC) poseen este plásmido EAF donde se localizan el grupo de genes *bfps* que codifican para el “Bundle Forming Pilus” (BFP), un pili de adherencia tipo IV. Por otro lado tenemos las EPEC atípicas (aEPEC), estas bacterias no poseen el plásmido EAF, aunque poseen otros factores de virulencia que no poseen las cepas tEPEC. Las tEPEC son la principal causa de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, mientras que las aEPEC han sido causa de brotes de enfermedades diarreicas en países desarrollados tanto en niños como en adultos y parecen estar más estrechamente relacionados con el grupo de *E. coli* productor de toxinas Shiga (STEC). Las cepas aEPEC poseen reservorios tanto humanos como animales, mientras que en el caso de las cepas tEPEC normalmente aparecen asociadas a contaminación fecal humana (Trabulsi et al., 2002; Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

Para describir la patogénesis de EPEC se ha propuesto un modelo de tres fases que incluye una adherencia localizada, una transducción de señales y una adherencia íntima (Donnenberg & Kaper, 1992). En la Figura 0.2 se detallan los genes implicados en esta patogénesis.

La primera fase de la patogénesis de EPEC consiste en la adhesión inicial de la bacteria a las células epiteliales asociada al pili BFP presente en el plásmido EAF de las cepas tEPEC. El BFP da lugar a interacciones entre las bacterias produciendo agregados y contribuyendo a la difusión de la infección en el intestino. Esta es una adherencia localizada (AL). En el caso de las cepas aEPEC, que carecen del plásmido EAF, pueden producirse tres tipos de adhesión, una adhesión similar a la localizada (“localized-like adhesión” – LAL-) mediada principalmente por la intimina, una adherencia difusa (AD) mediada por la adhesina Afa o una adherencia agregativa (AA) mediada por una adhesina agregativa (Trabulsi et al., 2002; Chen & Frankel, 2005; Hernandez et al., 2009).

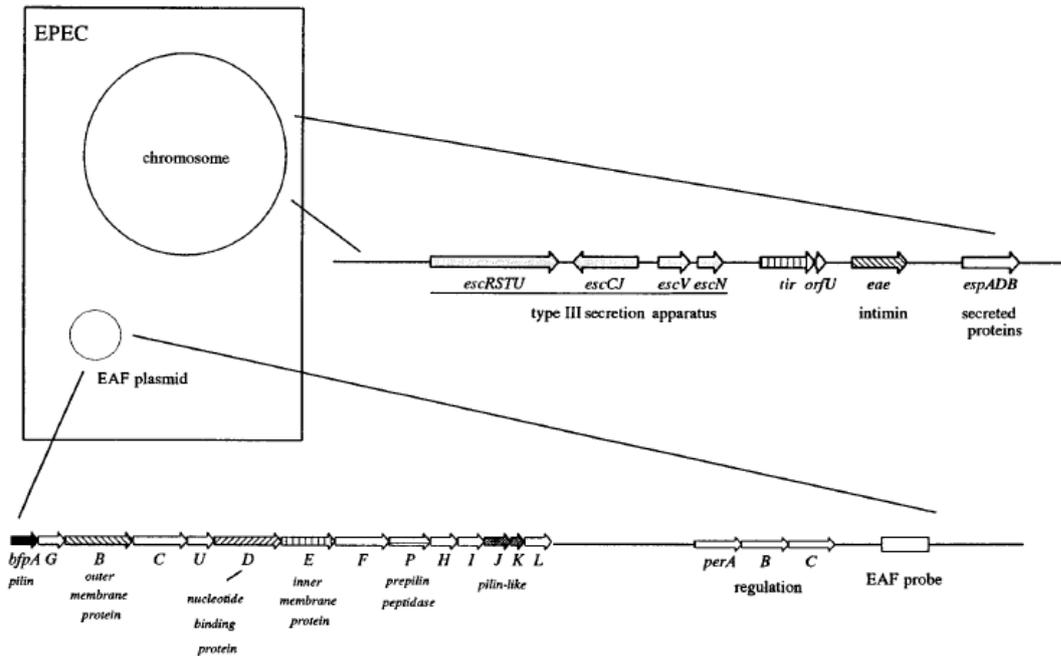


Figura 0.2. Esquema ilustrativo de los genes implicados en la patogénesis de EPEC (Nataro & Kaper, 1998).

La segunda fase de la patogénesis es la transducción de señales. EPEC secreta un gran número de proteínas a través del sistema de secreción tipo III. Se han identificado 12 genes (*esc* y *sep*) en la isla de patogenicidad LEE que participan en la formación de este sistema. Las proteínas que se secretan a través de este sistema de secreción incluyen Tir, EspA, EspB y EspD, que son esenciales para la transducción de señales y la formación de las lesiones de adhesión y borrado (“attaching and effacing”; A/E).

La tercera fase de la patogénesis de EPEC consiste en el borrado de los enterocitos, la formación de un pedestal en la membrana del enterocito y la adhesión íntima de la bacteria a la célula (lesiones A/E), todo ello mediado por la intimina. La secuencia C-terminal de 280 aminoácidos de esta intimina (Int280) es muy variable y define gran cantidad de subtipos de esta proteína (relacionados con el tropismo por los tejidos). Cuando la intimina se adhiere a su receptor (Tir) se desencadenan los efectos patogénicos de EPEC en la célula (Chen & Frankel, 2005; Hernandez et al., 2009).

3.2.6. EHEC:

Este patotipo comparte con EPEC la habilidad de producir lesiones de adhesión-borrado gracias a la presencia de la isla de patogenicidad LEE, pero su característica principal es la capacidad de producir toxinas denominadas toxinas Shiga (Stxs -debido a la similitud demostrada con las toxinas de *Shigella dysenteriae*-) o verotoxinas (VT -por el efecto citopático que producen en las células de la línea Vero-). Existen dos familias de toxinas Shiga, Stx1 y Stx2, que presentan un 55% de aminoácidos homólogos (Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

EHEC puede dar lugar a diarrea no hemorrágica, colitis hemorrágica (CH) y también al síndrome urémico hemolítico (SUH) y a la púrpura trombocitopénica. Las toxinas Shiga son producidas por la bacteria en el intestino grueso y ejercen una acción local al inducir apoptosis en las células epiteliales del intestino, dando lugar a diarrea hemorrágica, colitis hemorrágica, necrosis y formación de úlceras. Además estas toxinas pueden viajar a través del torrente sanguíneo hasta los riñones, allí dañan las células endoteliales del riñón y obstruyen la microvascularización a través de una toxicidad directa y una inducción de producción local de citoquinas y quimioquinas, dando lugar a inflamación renal. Este daño renal puede evolucionar al SUH, síndrome caracterizado por una triada de anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal. Los niños menores de 5 años y los ancianos son los principales afectados por este síndrome (Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

La transmisión se produce a través de alimentos o de agua contaminados, persona a persona o por contacto con animales infectados. La baja dosis infectiva de esta bacteria (menos de 100 células ingeridas son suficientes para la producción de enfermedad) junto con su resistencia a la acidez la convierten en un destacado patógeno alimentario. El serotipo O157:H7 es el más importante de este patotipo en Estados Unidos, Reino Unido y Japón, pero otros serotipos (particularmente los pertenecientes a los serogrupos O26 y O111) son importantes en otros países (Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

Aunque existen más de 200 serotipos de cepas de *E. coli* capaces de producir toxinas Shiga, la mayor parte no poseen la isla de patogenicidad LEE y no están

asociados a enfermedad en humanos. Esto ha llevado al uso del término de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) para designar a cualquier cepa de *E. coli* que produce toxinas Stxs y el término EHEC únicamente para las cepas que, además de producir Stx, contienen la isla de patogenicidad LEE. La existencia de un gran número de cepas de *E. coli* capaces de producir Stxs se debe a que los genes que codifican para estas toxinas se transmiten como parte de fagos lamboides. Sin embargo, a pesar de lo mencionado anteriormente, existen cepas LEE-negativas capaces de producir enfermedad, demostrando por tanto que existen factores de virulencia adicionales (Kaper et al., 2004; Welch, 2006).

Siempre se ha considerado como principal reservorio de este patotipo el tracto intestinal de los bovinos, aunque las cepas STEC pueden detectarse en el tracto intestinal de otros animales domésticos, especialmente pequeños rumiantes. También se han aislado de los suidos domésticos, perros y gatos y algunas especies de animales silvestres (Paton & Paton, 1998b).

4. VIRULENCIA DE STEC

4.1. Serotipos patógenos

Las cepas STEC se caracterizan mediante serotipificación. En función de la gravedad de la enfermedad que producen, los serotipos se clasifican en cinco patotipos designados con las letras A-E (Gyles, 2007):

A. Incluye las cepas O157:H7 y O157:NM que son considerados los serotipos más virulentos.

B. Incluyen los serotipos O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 y O145:NM, similares a las cepas O157 en producir enfermedades graves y brotes pero que ocurren con una menor frecuencia.

C. Está constituido por serotipos que están implicados en casos esporádicos de SUH con poca frecuencia pero no asociados con brotes. En este grupo se incluyen O91:H21 Y O113:H21.

D. Comprende numerosos serotipos asociados con casos esporádicos de diarrea.

E. Incluye un gran número de serotipos de STEC que no han sido asociados a enfermedad en humanos.

A continuación se revisa la patogénesis y los factores asociados con la virulencia de estas bacterias.

4.2. Patogénesis de STEC

La infección por STEC se produce por ingestión de comida o agua contaminados. Las cepas STEC, además de poseer una dosis infectiva muy baja (10-100 ufc), sobreviven en su paso a través del tracto gastrointestinal porque suelen ser resistentes a la acidez. Una vez en el intestino, y gracias a que poseen ciertos factores de virulencia, pueden ocasionar un proceso de mayor o menor gravedad (Paton & Paton, 1998a; Gyles, 2007; Farrokh et al., 2013). En la Figura 0.3 se presenta un esquema del proceso.

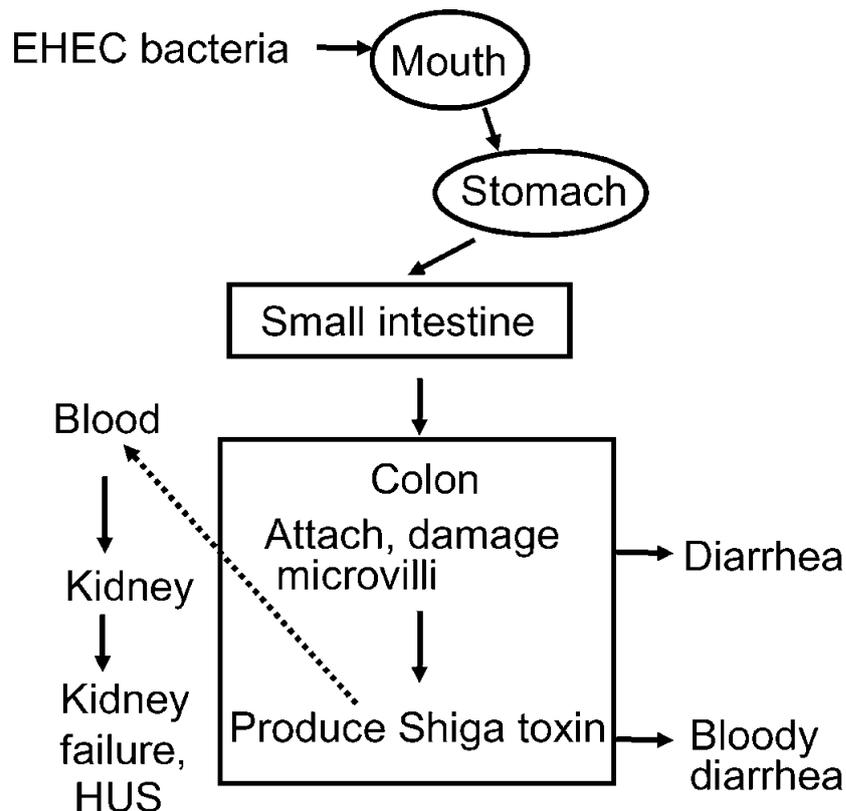


Figura 0.3. Esquema de la patogénesis de STEC en el hombre (Gyles, 2007).

4.2.1. Colonización del intestino

Una vez en el intestino las cepas de STEC proceden a su colonización mediante la adhesión a las células epiteliales, principalmente en el colon, aunque también en la parte distal del intestino delgado. Se distinguen dos tipos de adherencia: adherencia difusa (AD) y adherencia localizada (AL). En el primer caso, las bacterias se distribuyen más o menos uniformemente sobre la superficie de las células epiteliales mientras que en el segundo, las bacterias forman microcolonias en determinadas zonas de la superficie de estas células (Paton & Paton, 1998a).

Existen diferentes factores de virulencia asociados con esta adhesión a las células epiteliales del intestino. Entre estos factores de virulencia se encuentra la isla de patogenicidad LEE, presente en algunas cepas STEC y muy similar a la presente en las cepas EPEC, que da lugar a las denominadas lesiones de adhesión-borrado (A/E) (Paton & Paton, 1998a; Gyles, 2007).

Las proteínas codificadas por la isla de patogenicidad LEE (Tir, EspF, EspG, EspH, EspZ) y otras proteínas no codificadas por esta isla de patogenicidad son traslocadas por el sistema de secreción tipo III. La proteína Tir se inserta en la membrana celular de la célula hospedadora actuando como receptor para la intimina, aunque algunos componentes de la célula hospedadora también pueden constituir un sitio de unión para la intimina. La proteína Tir, junto con otras proteínas desencadenan una señal en cascada que da lugar a cambios en la célula del epitelio intestinal (Gyles, 2007).

Existe una clara asociación entre la presencia del gen que codifica para la intimina (*eae*) en cepas STEC y la aparición de procesos graves como colitis hemorrágica y SUH. De hecho, la presencia del gen *eae* en aislados procedentes de animales está comúnmente asociada a cepas de serogrupos asociadas a enfermedad en humanos como O157, O26, O111, etc. (Paton & Paton, 1998a). Se han descrito al menos 17 tipos de intimina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, δ/κ , ϵ , ζ , η , $\eta 2$, λ , μ , etc.) en función de la heterogeneidad de la parte C-terminal de la molécula. La intimina $\gamma 1$ se asocia con serotipos de STEC muy patógenos como O157:H7 y O145:NM (Gyles, 2007).

Otros factores de adherencia incluyen fimbrias, OMPs, el lipopolisacárido (LPS O157) o el plásmido pO157. El plásmido de STEC de 60 MDa conocido como pO157 podría tener un papel en la adherencia de la bacteria a las células del epitelio intestinal, aunque se necesitarían más estudios para confirmarlo, ya que hasta ahora los resultados obtenidos en diferentes estudios son contradictorios (Paton & Paton, 1998a).

4.2.2. Papel de las toxinas Shiga (Stx)

El factor de virulencia más importante de las cepas STEC son las toxinas Shiga (Stx). Existen dos tipos de Stxs denominadas Stx1 y Stx2. La molécula de la toxina Stx1, idéntica a la toxina Shiga tipo 1 producida por *Shigella dysenteriae*, presenta tres variantes antigénicas o subtipos (Stx1a, Stx1c y Stx1d), mientras que en el caso de la toxina Stx2 existen siete subtipos (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g). Las cepas que producen la toxina Stx2 (más la presencia del gen *eae*) tienen mayor probabilidad de producir SUH que las que producen la toxina Stx1 o ambas. Concretamente los subtipos Stx2a, Stx2c y Stx2d son los más asociados con patologías graves en enfermedad humana (Gyles, 2007; Bergan et al., 2012; Farrokh et al., 2013).

Las toxinas Shiga pertenecen a la familia de toxinas AB₅, con una subunidad A enzimáticamente activa y cinco subunidades B (7,7 KDa) idénticas, colocadas formando un anillo en cuyo poro central se ancla el C-terminal de la subunidad A (Figura 0.4). Las subunidades B son responsables de la unión a los receptores celulares, concretamente se unen al glicoesfingolípido Gb3 permitiendo la internalización de la molécula de la toxina. Tras la unión de la toxina se produce su internalización por endocitosis y su transporte hasta el aparato de Golgi y al retículo endoplasmático (RE). Para que la subunidad A ejerza su efecto es necesaria la acción de una proteasa (furina) escindiendo la subunidad en dos fragmentos, uno enzimáticamente activo denominado A1 (27,5 KDa) y otro más pequeño denominado A2 (4,5 KDa) que, tras la acción de la proteasa, permanecerán unidos por un enlace disulfuro hasta su llegada al RE, donde se producirá la rotura de este enlace debido las condiciones reductoras del RE. El fragmento A1 liberado es entonces traslocado al citosol donde ejercerá su acción citotóxica inactivando los ribosomas, al eliminar una adenina de la región 3' del rARN

28S. Como resultado se inhibe la síntesis proteica e incluso puede producirse la apoptosis de la célula (Gyles, 2007; Bergan et al., 2012).

Los genes que codifican las toxinas Shiga se encuentran localizados en el genoma de bacteriófagos lamboides denominados fagos-Stx. Estos fagos constituyen un grupo heterogéneo de elementos genéticos altamente móviles que pueden insertarse en sitios de unión específicos del cromosoma. Los fagos-Stx de cepas STEC pueden incluso infectar bacterias comensales del intestino, haciendo que puedan producir Stxs y por tanto agravando la enfermedad. Otra característica importante de los fagos-Stx es su estabilidad en el ambiente durante largos periodos de tiempo, pudiendo, como ya se ha dicho, insertarse en bacterias convirtiéndolas en productoras de toxinas Stxs (Bergan et al., 2012).

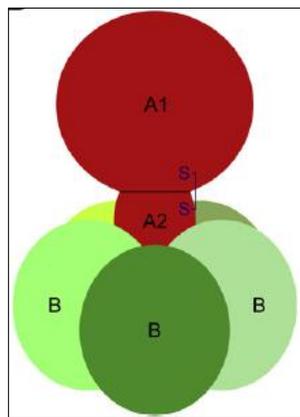


Figura 0.4. Representación esquemática de la estructura de las toxinas Shiga (Bergan et al., 2012).

La expresión del receptor para Stxs es un determinante de la susceptibilidad a la lesión celular, aunque también se requiere un transporte eficiente de la toxina. Tanto la cantidad como el tipo de Gb3 presente en las células influirán en la susceptibilidad a las toxinas Stx. En humanos, la expresión de Gb3 está restringida a ciertos tipos de células, principalmente en las células del epitelio y endotelio renales, células endoteliales de la lámina propia del intestino, plaquetas y linfocitos B (Gyles, 2007; Bergan et al., 2012).

La mayor parte de los síntomas de la colitis hemorrágica y del SUH se atribuyen a la acción de las toxinas Stx. La primera se asocia con lesiones en las células endoteliales de pequeños vasos sanguíneos del colon. El SUH se atribuye a lesiones

Introducción general

del glomérulo renal debidas a daños en las células endoteliales, que se inflaman y se desprenden de la membrana basal formando trombos de fibrina que estrechan y ocluyen el capilar. La falta de aporte sanguíneo al glomérulo es la principal causa de la pérdida de la función renal, pero el daño del epitelio del glomérulo también contribuye (Gyles, 2007).

4.2.3. Otros factores de virulencia

4.2.3.1. Flagelina H7 y LPS O157: Una característica destacada de la lesión intestinal en la infección con STEC O157:H7 es la inflamación. Se ha propuesto que la flagelina H7 desempeña un importante papel en las señales proinflamatorias en las células epiteliales del colon. Se ha visto además que el LPS también participa en la respuesta inflamatoria a nivel vascular. El LPS O157 parece unirse a las plaquetas (en mayor proporción que el LPS de otras cepas EHEC) lo que desemboca en su activación (Gyles, 2007).

4.2.3.2. Enterohemolisina: Presente en la mayor parte de cepas STEC, la enterohemolisina pertenece a la familia de toxinas RTX y contribuye al desarrollo de enfermedad a través de la lisis de eritrocitos y la liberación de hemoglobina como fuente de hierro para la bacteria. También puede contribuir alterando la membrana de gran variedad de tipos celulares y con su capacidad para inducir la producción de citoquinas (Gyles, 2007).

4.2.3.3. Subtilasa: La subtilasa (SubAB) es una toxina AB₅ producida por ciertas cepas de *E. coli* asociadas a enfermedad en humanos. La SubAB está compuesta por una subunidad A (35 KDa) con actividad enzimática y cinco subunidades B (13 KDa) formando un pentámero que se une a receptores específicos de la superficie celular (Paton et al., 2004).

Tras la internalización en la célula, la SubAB llega al RE donde se une al chaperón BiP, provocando la activación de la quinasa del RE (similar a una proteinquinasa ARN dependiente) y la consecuente inhibición de la síntesis proteica que resultará finalmente en la apoptosis celular (Michelacci et al., 2013).

Introducción general

Hasta ahora la SubAB ha sido identificada casi exclusivamente en cepas STEC, en particular en cepas que no presentan la isla de patogenicidad LEE. Existe la hipótesis de que la SubAB contribuye a la patogénesis de cepas STEC asociadas a enfermedad en humanos actuando sinérgicamente con las toxinas Stx. Se ha visto, en experimentos realizados con ratones, que la SubAB da lugar a alteraciones características del SUH producido por Stx, así como un extenso daño en la microvascularización y a trombosis y necrosis en cerebro, riñones e hígado (Gyles, 2007; Paton & Paton, 2010; Michelacci et al., 2013).

Originariamente la SubAB fue aislada de una cepa de *E. coli* O113:H21 (98NK2) procedente de un brote de SUH en el sur de Australia. En un plásmido de virulencia denominado pO113 se encontraba el operón que codifica para la subtilasa (*subAB*) además de un gen que codifica para una adhesina autoaglutinante (*saa*), probablemente asociada a la colonización de las células del epitelio intestinal (Paton et al., 2001; Michelacci et al., 2013).

Se han descrito además dos cepas Stx-negativas capaces de producir SubAB (ED 32 y ED 591). Los genes *subA* y *subB* eran idénticos entre estas dos cepas y similares en un 90% a los presentes en el plásmido pO113 de la cepa 98NK2. Además estas cepas no presentaban la isla de patogenicidad LEE ni el gen *saa*, pero si albergaban cerca de los genes *subAB* un gen que codifica para un factor de invasión descrito en ETEC (*tia*). Se ha encontrado una región cromosómica idéntica con los genes *subAB* y *tia* en otras cepas STEC lo que sugiere la existencia de una isla de patogenicidad que contiene los genes *subAB* y *tia* (Tozzoli et al., 2010; Michelacci et al., 2013).

Por tanto existen dos variantes alélicas de los genes *subAB*, la presente en el plásmido pO113 junto con el gen *saa* denominada *subAB*₁ y la localizada en una isla de patogenicidad junto con el gen *tia* denominada *subAB*₂ (Michelacci et al., 2013).

5. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Aunque las infecciones por STEC no suelen ser tratadas de forma agresiva con terapia antimicrobiana y muchas cepas son susceptibles a un gran número de antibióticos, estudios recientes demuestran que la resistencia a antibióticos de STEC está aumentando (Schroeder et al., 2002; Mora et al., 2005).

Existen principalmente cuatro causas por las que las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos (Martínez Álvarez, 2007):

- Presencia de enzimas específicos que modifican o inactivan el antibiótico antes o después de penetrar en la bacteria.
- Modificación de la membrana bacteriana, disminuyendo la permeabilidad al antimicrobiano.
- Expulsión activa del antibiótico al exterior de la bacteria.
- Síntesis de una molécula alternativa o modificación de la diana celular.

Estos mecanismos no solo se dan de forma aislada sino que pueden aparecer dos o más dando un nivel final de resistencia del microorganismo.

5.1. Enzimas modificadores

5.1.1. β -lactamasas: Las β -lactamasas (bla) son enzimas específicas que se unen a los antibióticos β -lactámicos hidrolizándolos para que no puedan ejercer su acción. Se conocen entre 350 y 400 β -lactamasas, algunas asociadas a determinadas especies bacterianas y otras ampliamente distribuidas. Existen al menos diez subgrupos de genes que codifican para las β -lactamasas: *TEM*, *SHV*, *PSE*, *OXA*, *PER*, *CTX-M*, *CMY*, *ACC*, *DHA*, *KPC*.

5.1.2. Enzimas modificadores de aminoglicósidos: La resistencia a los aminoglicósidos se produce principalmente por enzimas capaces de modificar los grupos amino o hidroxilo de la molécula del antibiótico evitando así que este se una a las proteínas ribosomales diana y por tanto inhibiendo su acción. Existen tres tipos de enzimas: O-adeniltransferasas, N-acetiltransferasas y O-fosfotransferasas. Entre los genes de O-adeniltransferasas se encuentran los del tipo *aadA* que median la resistencia a

estreptomicina y espectinomicina, existen al menos seis subtipos *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA7*, *aadA21*, *aadA22* y *aadA23*. Entre los genes de O-fosfotransferasas se encuentran el *strA* y el *strB*, únicamente median la resistencia a estreptomicina y normalmente se encuentran juntos y precedidos del gen *sul2* (confiere resistencia a sulfonamidas).

5.1.3. Enzimas modificadores de fenicoles: Uno de los principales mecanismos de resistencia a fenicoles es la inactivación mediante la enzima cloranfenicol acetil transferasa (Cat) de tipo A o B.

5.2. Expulsión activa del antibiótico

5.2.1. Bombas de expulsión de tetraciclinas: Existen más de 35 genes que codifican resistencia a tetraciclina entre los que se encuentran *tetA*, *tetB*, *tetD*. Estos genes codifican para bombas de expulsión asociadas a membrana y poseen 12 segmentos transmembrana capaces de exportar tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, y doxiciclina. Además, en el caso de la proteína TetB también es capaz de exportar minociclina.

5.2.2. Proteínas que expulsan fenicoles: Existen proteínas transportadoras específicas que expulsan de forma activa el cloranfenicol o cloranfenicol/florfenicol de las células bacterianas. Estas proteínas son Cml, codificado por genes *cmlA* y responsable de transporte de cloranfenicol, y Flo, codificado por genes *floR* y transporta tanto cloranfenicol como florfenicol.

5.3. Síntesis de enzimas alternativos o modificación de la diana celular

5.3.1. Resistencia al trimetoprim: Existen más de 30 genes, pero en todos ellos la resistencia se da gracias a la producción de una dihidrofolato reductasa (*dhfr*) altamente resistente a este antibiótico. Existen dos tipos mayoritarios de estos genes, *dhfrA* y *dhfrB*.

5.3.2. Resistencia a sulfamidas: Los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* codifican formas resistentes de la enzima dihidropteroico sintetasa. Esta enzima interviene en la síntesis del ácido

dihidripterico, compuesto intermediario en la formación del ácido tetrahidrofólico, cofactor necesario para la biosíntesis de bases nitrogenadas y aminoácidos.

5.3.3. Resistencia a quinolonas: La resistencia a quinolonas puede deberse a mutaciones puntuales en el gen *gyrA*, que codifica para la subunidad A de la ADN-girasa, ya que esta es la diana de estos antibióticos.

5.4. Elementos genéticos móviles (EGMs)

En la dispersión de la resistencia a agentes antimicrobianos participan *elementos* como el sistema integrón-casete genética, los transposones y los plásmidos.

5.4.1. Integrones: Los integrones son sistemas naturales de clonación y expresión que incorporan pautas abiertas de lectura (ORFs) y las convierten en genes funcionales. Contienen una integrasa (*intI*), encargada de la recombinación entre el sitio de recombinación primario *attI* y el secundario *attC*. Este último junto con el ORF constituye lo que se denomina casete genética. La inserción de la casete genética en el sitio *attI* permite su expresión por un promotor que solapa con el gen *intI* (Carattoli, 2001; Martínez Álvarez, 2007).

Podemos diferenciar dos tipos de integrones: integrones de resistencia (RI) y superintegrones (SI).

Los RI presentan genes de resistencia a antimicrobianos y pueden encontrarse en transposones, plásmidos o en el cromosoma bacteriano. En función de la secuencia de aminoácidos de la integrasa distinguimos tres clases de RIs. Los mejor caracterizados y más ampliamente distribuidos son los integrones de clase 1 (Figura 0.5) que están constituidos por un segmento conservado en el extremo 5' (5'CS) que contiene el gen *intI1* (integrasa) y otro segmento conservado en el extremo 3' (3'CS) que generalmente presenta el gen *qacEΔ1*, que confiere resistencia a antisépticos y desinfectantes, el gen *sul1*, que lo hace a sulfonamidas y una ORF de función desconocida (*orf5*). Las casetes genéticas de resistencia a antibióticos se insertan en el sitio *attI*, entre los segmentos 5'CS y 3'CS, lo que se denomina región variable (RV) (Carattoli, 2001; Martínez Álvarez, 2007).

Los SI son de mayor tamaño que los RI, se localizan en el cromosoma y contienen casetes genéticos con gran variedad de funciones (Martínez Álvarez, 2007).

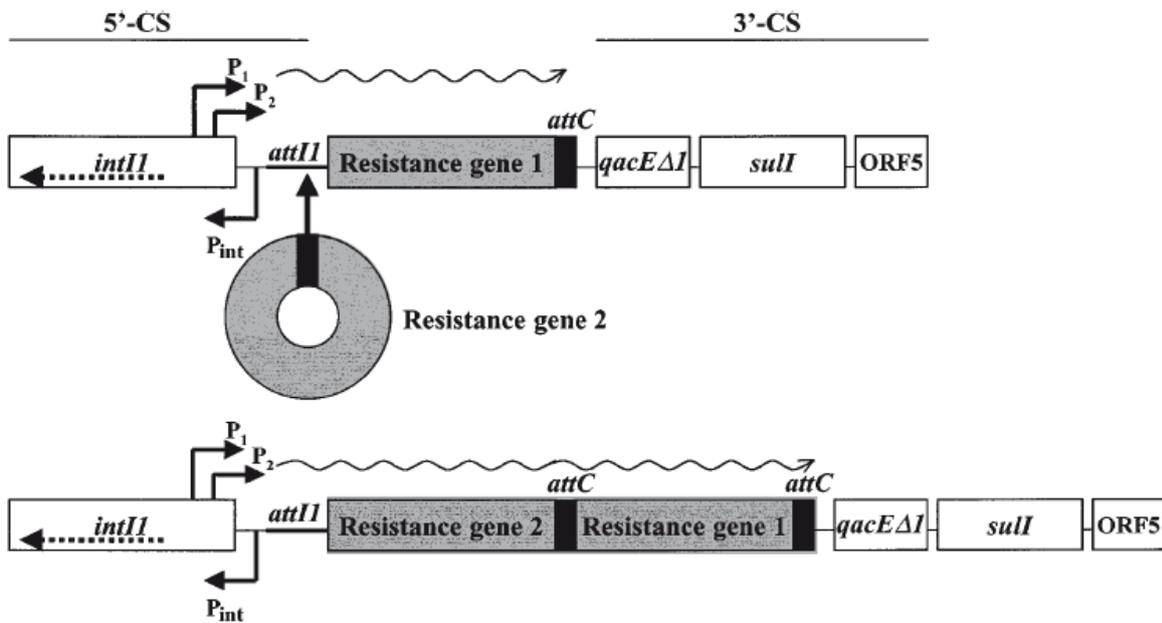


Figura 0.5. Representación esquemática de un integrón de clase 1 y modelo de inserción de una casete genética en este integrón (Carattoli, 2001).

5.4.2. Transposones: Son EGMs que, gracias a la presencia de la enzima transposasa y proteínas reguladores, promueven su propia translocación de un sitio donador a un sitio receptor sin necesidad de que exista homología entre ambos. Contienen genes accesorios que pueden conferir resistencia a antimicrobianos.

5.4.3. Plásmidos: Son elementos extracromosómicos con capacidad de replicación autónoma. Suelen codificar funciones no esenciales para la célula como virulencia o sistemas antimicrobianos que aportan una ventaja selectiva. Además, algunos presentan genes (*tra*) que participan en el proceso de conjugación. La transferencia puede ocurrir entre bacterias filogenéticamente distantes, lo que puede tener consecuencias evolutivas. Finalmente es importante destacar que pueden integrarse en el cromosoma bacteriano, con lo que la presencia de la región *tra* permite la movilización de ADN cromosómico entre bacterias.

6. TIPIFICACIÓN DE STEC Y EPEC

Tradicionalmente la caracterización de cepas de *E. coli* comienza con la serotipificación. Ésta se realiza en base sus antígenos superficiales O (somáticos) y H (flagelares). Se dispone de sueros conteniendo anticuerpos frente a estos antígenos; concretamente, para los antígenos O -del 1 al 181- y para los antígenos H -del 1 al 56-. Sin embargo, hay que señalar que aunque pueden adquirirse “kits” comerciales para la tipificación de algunos serogrupos, la serotipificación suele estar restringida a los laboratorios de referencia (Kaper et al., 2004; Gyles, 2007; Farrokh et al., 2013).

El fagotipado es un método de subtipificación utilizado principalmente en las cepas STEC del serogrupo O157. Consiste en la clasificación de una cepa en función de su respuesta lítica a un determinado número de bacteriófagos y permite, en estudios epidemiológicos, una rápida diferenciación entre aislados aunque la mayoría de las cepas pertenece a un limitado número de fagotipos (Khakhria et al., 1990). Por tanto, normalmente se combina con otras técnicas como la electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Debido a su alto nivel de discriminación, la técnica PFGE está considerada como el método estándar para la tipificación de STEC, especialmente si se utiliza el protocolo de PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org>) (Farrokh et al., 2013).

En esta técnica se separan mediante electroforesis los fragmentos del cromosoma bacteriano generados tras la digestión del ADN con una enzima de restricción específica. La comparación del patrón, de entre 20 y 25 bandas, obtenido de los diferentes aislados permite determinar la relación entre las cepas.

Para la selección de cualquier procedimiento de tipificación es importante considerar la reproductibilidad tanto intralaboratorial como interlaboratorial. En el caso del PFGE ésta se ve influenciada por la preparación de la muestra de ADN, la elección de la enzima de restricción y las condiciones de electroforesis. La elección de la enzima de restricción es la variable más importante. El establecimiento de relaciones epidemiológicas y diferencias significativas entre aislados se basa en la habilidad para reconocer patrones de bandas de fragmentos de restricción, por lo que el ADN deberá

ser digerido en un número manejable de fragmentos (no menos de 10 y no más de 25 o 30 fragmentos) con una distribución adecuada. Existen diferentes enzimas de restricción que cumplen lo mencionado para determinadas especies bacterianas y que se utilizan de modo estandarizado; en el caso de *E. coli* estas enzimas son *XbaI*, *BlnI* (*AvrII*), *NotI* y *SfiI* (Goering, 2010).

Los eventos genéticos que pueden influir en el patrón de bandas de PFGE son inserciones, deleciones, reordenamientos y sustituciones de una sola base. En función de si afectan o no los sitios de restricción, estos eventos pueden dar lugar a diferencias de hasta cuatro bandas respecto a la cepa origen. Una de las dificultades más comunes en los análisis epidemiológicos es la ausencia de la cepa origen, por lo que las diferencias entre aislados pueden ir de cuatro a seis bandas (Figura 0.6) (Goering, 2010).

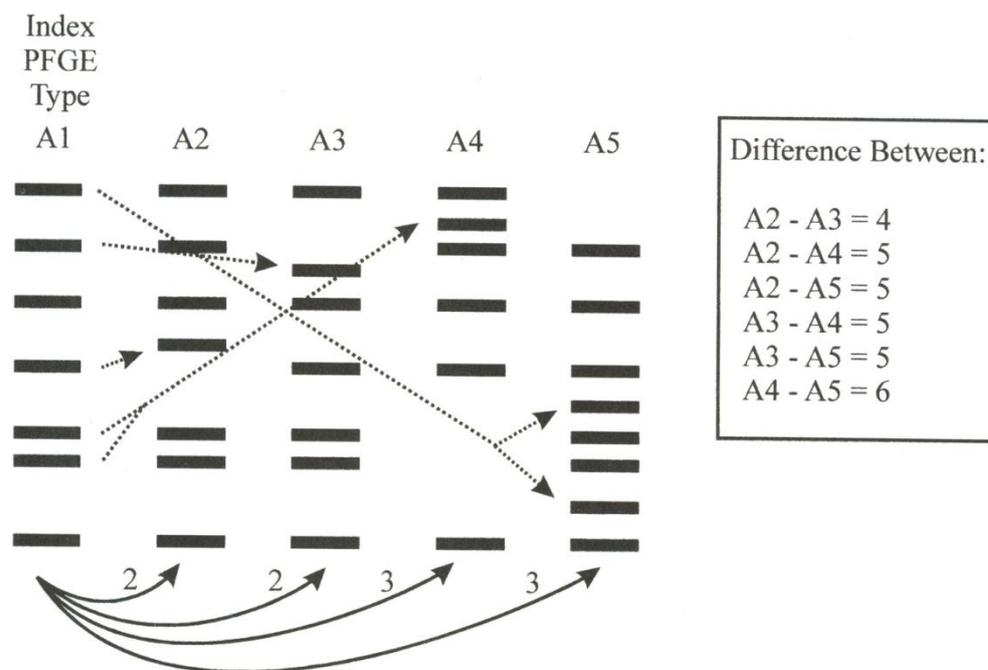


Figura 0.6. Ilustración de diferencias entre patrones de PFGE comparando entre aislados y con la cepa origen (Goering, 2004).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método más rápido, sensible y fiable para la detección de *E. coli* en muestras procedentes de alimentos, ambientales o clínicas. Además, puede utilizarse junto con métodos de cultivo convencionales o métodos de tipado molecular (Elizaquível et al., 2011). El uso de la PCR permite la detección de cepas STEC a través de la búsqueda de los genes que codifican

para las toxinas Shiga (*stx*) en muestras microbiológicamente complejas (como heces o alimentos), incluso en caso de que el microorganismo no sea viable. La sensibilidad de la PCR en muestras de heces y alimentos se ha visto aumentada en gran medida mediante la realización de un enriquecimiento previo de estas muestras (Paton & Paton, 1998a).

Además de protocolos de PCR para la detección de los genes que codifican para las toxinas *Stxs* (*stx1* y *stx2*) (Pollard et al., 1990; Olsen et al., 1995; Paton & Paton, 1998b) y sus variantes alélicas (Scheutz et al., 2012) existen protocolos para la detección de otros factores de virulencia (*eae*, *EHEC-hlyA*, etc.) importantes para determinar la capacidad de las cepas STEC de producir enfermedad en humanos y la gravedad de esta enfermedad (Paton & Paton, 1998a).

También se han desarrollado métodos de PCR para la detección de determinados antígenos O (O157, O26, O91, O103, O111, O121, O145, O146, etc.) (Desmarchelier et al., 1998; Perelle et al., 2004; Liu et al., 2007; Monday et al., 2007; Bugarel et al., 2010) y de antígenos H mediante la secuenciación del gen que codifica para este antígeno (*fliC*) (Machado et al., 2000) y poder así determinar el serotipo.

Para la tipificación de las cepas de EPEC se pueden emplear diferentes métodos; en esta tesis se ha utilizado el método MLST (Multilocus Sequence Typing) y el método PFGE.

Como ya se ha dicho, los métodos moleculares de tipificación se utilizan para la caracterización y la determinación de la relación existente entre cepas procedentes de diferentes orígenes. Uno de los más interesantes es el MLST, que se lleva a cabo mediante la obtención de las secuencias de ADN de fragmentos internos de siete genes “housekeeping” (entre 450 y 500 pb). Para cada uno de estos genes, las secuencias diferentes se corresponden con diferentes números de alelo. Así, los números de alelos obtenidos a partir de los 7 genes dan lugar a lo que se conoce como perfil de alelos o “sequence types” -ST-.

En la mayoría de los métodos de tipificación molecular, la relación entre aislados se representa gráficamente en un dendrograma. En el caso del MLST se

utilizan las diferencias por pares entre perfiles de alelos de los aislados para construir dicho dendrograma. Aislados con perfiles de alelos idénticos se consideran miembros del mismo clon, mientras que aislados con perfiles de alelos similares que aparecen en un mismo grupo del dendrograma se consideran del mismo linaje o complejo clonal. Otra forma de analizar los datos del MLST es mediante el uso del algoritmo BURST (“Based Upon Related Sequence Types”) que identifica complejos clonales, genotipos ancestrales (de origen) y patrones de descendencia evolutiva. En primer lugar, este algoritmo identifica los grupos clonales (aislados con genotipos relacionados) que incluirían todos los aislados que descienden de un antecesor común. A continuación determina el posible antecesor de cada grupo clonal y finalmente el patrón de descendencia evolutiva de todos los aislados del grupo clonal a partir de este antecesor (Hanage et al., 2004). La diversificación de un genotipo producirá inicialmente variantes que se diferencian únicamente en uno de los siete loci (“single-locus variants” –SLVs-). La representación gráfica del algoritmo BURST es un diagrama formado por círculos concéntricos (diagrama de ojo de buey; Figura 0.7). En el círculo central aparece el antecesor mientras que en el primer círculo adyacente a este aparecerán los SLVs y en el segundo las variantes que difieran del genotipo de origen en dos loci (“double-locus variant” –DLVs-). Los ST que forman parte del grupo clonal pero no son SLVs o DLVs del ST de origen se denominan satélites y aparecerán unidos al ST al que más se asemejen. El análisis BURST nos proporciona una hipótesis acerca del origen y los patrones de descendencia dentro de grupos clonales que puede ser complementada con información adicional (Hanage et al., 2004).

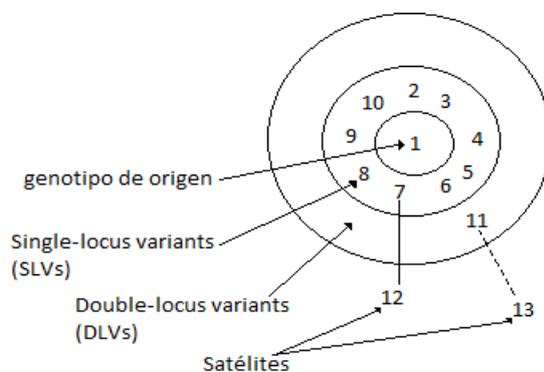


Figura 0.7. Diagrama de “ojo de buey” obtenido por el algoritmo BURST de un complejo clonal (Hanage et al., 2004).

7. IMPORTANCIA SANITARIA DE STEC Y EPEC

7.1. Datos epidemiológicos

Según la “European Food Safety Authority” (EFSA, 2012b) en el año 2010 se diagnosticaron 4.000 casos de enfermedad por STEC en la Unión Europea (UE), representando un 12% más que en el año anterior. En ese año, la tasa de mortalidad por STEC fue del 0,39% (ocho *exitus letalis* de un total de 2.077 casos confirmados) con otros 222 pacientes desarrollando SUH (5,5% del total de casos). El 65,8% de los casos de SUH se diagnosticaron en niños menores de cuatro años (un 42,5% por cepas pertenecientes al serogrupo O157 y un 19,2% por cepas del serogrupo O26). La distribución de casos por STEC en el año 2010 presentaba un marcado patrón estacional, aumentando durante el verano y principios del otoño.

A nivel nacional, se declararon 37 casos (36 por *E. coli* O157:H7) en siete Comunidades Autónomas, dos de ellos en pacientes de Castilla y León (Instituto de Salud Carlos III, 2010).

En el año 2011 en la UE la EFSA informó de un brote de SUH. Hubo 3.126 casos de diarrea y 773 de SUH, con un total de 46 muertes (EFSA, 2011). Este brote fue debido a una cepa de *E. coli* perteneciente al serotipo O104:H4 que poseía factores de virulencia comunes a los patotipos EAEC y STEC, factores de virulencia de *E. coli* patógenos extraintestinales y resistencia a numerosos antibióticos. El origen del brote fue atribuido a semillas de fenogreco importadas de África (aunque no se consiguió aislar la cepa de ninguna de las muestras analizadas) (Mora et al., 2011). Este caso nos da idea de la capacidad de las cepas de *E. coli* para adquirir factores de virulencia y convertirse en cepas altamente patógenas.

Una diferencia epidemiológica importante entre los serotipos típicos y atípicos de EPEC es su distribución geográfica. Los serotipos tEPEC han sido normalmente asociados con brotes de diarrea infantil en diferentes países. En el pasado, estos serotipos eran identificados frecuentemente en países desarrollados como causa de brotes y casos esporádicos de diarreas, pero en la actualidad son poco comunes. A partir del año 2000, en los países desarrollados predominan los serotipos de cepas

aEPEC. Así, en el Reino Unido, las cepas que poseían el plásmido EAF (tEPEC) representaban únicamente el 10% del total de cepas de EPEC aisladas (Trabulsi et al., 2002).

En países en vías de desarrollo la situación no es tan clara. Estudios realizados en Brasil en las décadas de 1980 y 1990 mostraban una frecuencia bastante elevada de serotipos de cepas tEPEC. Sin embargo, trabajos posteriores encontraron una prevalencia baja de tEPEC y una frecuencia más elevada de aEPEC. Esto sugiere que los cambios que, en su momento se produjeron en países desarrollados, están produciéndose ahora en Brasil. Esto podría deberse a las mejoras en los tratamientos y en las condiciones sanitarias y también al control de las infecciones hospitalarias. Además, es posible, que el aumento en la frecuencia de cepas aEPEC pudiera tener un origen similar al que ocasionó la aparición y aumento de la frecuencia de *E. coli* O157:H7 y otros serotipos STEC (Trabulsi et al., 2002).

7.2. El ganado ovino como fuente de STEC y EPEC

Los pequeños rumiantes se consideran un reservorio de STEC. Frecuentemente se han aislado cepas STEC tanto de corderos como de animales adultos en diferentes países (Australia, Brasil, India, Nueva Zelanda, España, Estados Unidos, etc). Algunas cepas de este origen pertenecían a los serotipos asociados con enfermedad en humanos pero otras carecían de importantes factores de virulencia (intimina, hemolisina, *stx2*, etc.) (Kaspar et al., 2009).

En muestras de ovino analizadas en la UE para STEC, se detectaron, en el año 2010 en Alemania y Hungría, porcentajes positivos del 2,4% y 72,7%, respectivamente (ninguna de las cepas pertenecía al serogrupo O157, aunque se halló una cepa O91 en Alemania). Entre los años 2007 y 2010 se detectaron cepas STEC en muestras de ovino en otros países miembros de la UE como son Portugal, Austria y Suecia y algunas pertenecían al serogrupo O157 (EFSA, 2012b).

Parece que en alimentos de origen ovino, la contaminación con STEC no suele ser excesivamente alta y un buen número de las cepas aisladas de leche cruda no pertenecen a serogrupos asociados con enfermedad en humanos ya que, por ejemplo,

las cepas no-O157 son más frecuentes que las O157. Sin embargo se ha observado que cepas STEC de este origen pueden sobrevivir durante el proceso de fabricación del queso. Por tanto, las variedades de queso elaboradas con leche cruda podrían representar un riesgo de enfermedad por STEC (Kaspar et al., 2009).

En un trienio (2007-2010), siete países de la UE informaron acerca de la presencia de STEC en carne de ovino, hallándose muestras positivas únicamente en Alemania. No se detectaron muestras positivas en leche de oveja y cabra en el período 2009-2010 pero sí en quesos elaborados con leche cruda y pasteurizada de ovino en Francia y Eslovaquia (EFSA, 2012b).

Hay que considerar que los datos acerca de la incidencia de STEC tanto en muestras clínicas como en las obtenidas de animales y alimentos proceden de trabajos que utilizan diferentes métodos analíticos y de muestreo. Así, en muchos países se investiga sólo la presencia del serogrupo O157 y son muy pocos los investigadores que utilizan métodos para la detección de cepas STEC no-O157 por lo que parece evidente que la importancia de estas últimas podría, seguramente, estar subestimada (EFSA, 2012b).

Por lo que respecta a EPEC, no se han detectado cepas tEPEC en animales lo que sugiere que es el hombre su reservorio (Trabulsi et al., 2002). Por otra parte, datos recientes ponen de manifiesto un incremento significativo de la incidencia de cepas aEPEC tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. Además, son numerosos los trabajos en los que se aíslan cepas aEPEC de animales sanos y enfermos pertenecientes a diversas especies entre las que se incluyen vacuno, pequeños rumiantes, porcino y aves de corral (Hernandes et al., 2009).

7.3. Brotes debidos a STEC asociados con leche y productos lácteos

Como ya se ha señalado, los rumiantes son el principal reservorio de STEC, por lo que estos animales pueden constituir el origen de la infección. Esta puede ocurrir por contacto directo con los animales o su ambiente o por consumo de agua o alimentos contaminados. También por contacto persona-persona (Tabla 0.3). Los brotes por STEC normalmente se asocian al consumo de carne poco cocinada, agua,

productos lácteos elaborados con leche cruda, vegetales o alimentos listos para el consumo. En un 18,8% de los brotes producidos por cepas no-O157 el vehículo de transmisión no pudo ser identificado (Farrokh et al., 2013).

Tabla 0.3. Origen de los brotes de infección por cepas STEC O157:H7 y no-O157:H7 (Kaspar et al., 2009).

Vehículo	STEC no-O157:H7	<i>E. coli</i> O157:H7
Contacto con animales	6,2%	9,7%
Agua	10,0%	25,6%
Contacto persona-persona	28,8%	6,8%
Lácteos	10,0%	12,5%
Carne	11,2%	24,6%
Frutos	6,2%	9,2%
Otros Alimentos	8,8%	5,8%
Desconocidos	18,8%	5,8%

Como muestra la Tabla 0.3, el serogrupo O157 parece ser la principal causa de los brotes ocasionados por STEC, pero el diseño y utilización de métodos para la detección de serogrupos STEC no-O157 está poniendo de manifiesto la importancia de estas cepas en infecciones alimentarias. Así, en Estados Unidos, en el año 2006, se declaró un aumento de entre el 20 y el 50% en infecciones por STEC asociadas a cepas no-O157 (Farrokh et al., 2013). Creemos que es muy necesario diseñar métodos asequibles para la detección de cepas STEC no-O157 ya que las disponibles son muy laboriosas y poco útiles para un diagnóstico rutinario.

Un número significativo de brotes debidos a cepas STEC se ha relacionado con leche y productos lácteos de diferentes especies animales, sobre todo de vacuno. Hay datos procedentes de Europa, Estados Unidos y Canadá que atribuyen la infección al consumo de leche cruda (vaca y cabra), debiéndose la mayoría a *E. coli* O157 aunque, en algunos casos, otros serogrupos/serotipos (O22:H8, O110:NM, O80:NM y O145) fueron identificados como agentes causales. La mayoría de las cepas STEC responsables de los brotes producidos por quesos elaborados con leche cruda eran STEC O157 aunque, como en el caso de la leche, otros serogrupos/serotipos (O27:H20, O103, O26, O145, O27:H20, O104:H21) fueron identificados como agentes responsables de los procesos. También se han descrito brotes de infección por STEC

asociados a leche y productos lácteos pasterizados. En estos casos, la presencia de cepas STEC se debió a un fallo en el tratamiento o a una contaminación posterior (Farrokh et al., 2013). Por lo que concierne a la leche de oveja y sus productos derivados, no se han declarado brotes aunque la presencia de cepas STEC en leche y queso sugiere que estos alimentos representan un riesgo (Kaspar et al., 2009; EFSA, 2012a).

8. PAPEL DEL ENVASADO ACTIVO EN EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS Y EN QUESO DE OVEJA

8.1. Envasado activo

La mayor demanda por parte de los consumidores de alimentos mínimamente procesados, los cambios en la comercialización asociados a la globalización, la logística para captar consumidores, las nuevas técnicas de distribución (como la venta por internet), la aplicación de sistemas automatizados en los centros de distribución y los requisitos más estrictos respecto a la inocuidad de los alimentos han sido determinantes para innovar la tecnología del envasado de alimentos (Singh et al., 2011).

Entre estas innovaciones destaca el envasado activo, que puede definirse como la *“forma de envasado en la que el envase, el producto y el ambiente interactúan para prolongar la vida útil o mejorar la seguridad o las propiedades sensoriales manteniendo la calidad del producto”* (Appendini & Hotchkiss, 2002; Kerry et al., 2006; Singh et al., 2011).

El envasado activo está diseñado para realizar otras funciones además de la de proporcionar una barrera entre el producto y el ambiente exterior, utilizando las posibles interacciones entre el envase y el alimento de un modo positivo para mejorar la calidad y aceptabilidad del alimento. Este tipo de envasado controla los mecanismos de deterioro del alimento aumentando su vida útil bien liberando sustancias de interés (antimicrobianos, antioxidantes, aromas; etc. –emisores-) y/o eliminando compuestos indeseables (oxígeno, etileno, olores, etc. –absorbedores-) del producto envasado o de

su entorno (García et al., 2006; Kerry et al., 2006; Singh et al., 2011). También puede emplearse para controlar microorganismos patógenos.

La contaminación microbiana y el crecimiento de los microorganismos reducen la vida útil de los alimentos y aumentan el riesgo de enfermedad. Los métodos tradicionalmente utilizados para proteger los alimentos frente al crecimiento microbiano incluyen diversas estrategias como son el tratamiento térmico, la congelación, la refrigeración, el envasado a vacío o en atmósfera modificada o la adición de agentes antimicrobianos. 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 (Appendini & Hotchkiss, 2002; Kerry et al., 2006).

La aplicación del agente antimicrobiano al envase activo puede realizarse de varias formas (Appendini & Hotchkiss, 2002):

- Colocando dentro del envase etiquetas, bolsitas o almohadillas conteniendo agentes antimicrobianos volátiles.
- Incorporando el agente antimicrobiano, volátil o no volátil, directamente en los polímeros.
- Recubriendo o adsorbiendo los agentes antimicrobianos en la superficie del material de envasado.
- Inmovilizando los agentes antimicrobianos en el polímero del material de envasado mediante enlaces iónicos o covalentes.
- Utilizando materiales de envasado como el quitosano con actividad antimicrobiana propia.

Un amplio rango de sustancias (ácidos orgánicos, bacteriocinas, extractos de especias, tiosulfatos, enzimas, proteínas, isotiocianatos, antibióticos, fungicidas, agentes quelantes, parabenos y metales) pueden tener efecto antimicrobiano al ser incorporadas en materiales de envasado. La mayoría de los materiales utilizados hasta ahora son plásticos sintéticos como: polietileno de baja/alta densidad (LDPE/HDPE), polipropileno (PP), etileno-acetato de vinilo (EVA), policloruro de vinilo (PVC),

polietilentereftalato (PET), poliestireno (PS), etc. Además, existen materiales de envasado comestibles y biodegradables que pueden ser de origen animal o vegetal formados a partir de proteínas (colágeno, gelatina), polisacáridos (almidón, celulosa) o lípidos (ceras, resinas). Uno de los principales problemas del envasado activo reside en la liberación controlada del agente antimicrobiano presente en el material de envasado (Han, 2005; García et al., 2006; Singh et al., 2011).

Para obtener un envasado activo eficaz frente a los microorganismos, se debe de considerar tanto el microorganismo que se desea controlar como la composición del alimento a envasar. El compuesto antimicrobiano debe elegirse en función de su actividad, mecanismo de acción, composición química y las características de los microorganismos diana. La actividad de los agentes antimicrobianos que difunden desde el material de envasado al alimento dependerá, al menos en parte, de sus cinéticas de difusión, mientras que los agentes antimicrobianos unidos al polímero del material de envasado necesitan permanecer activos cuando se encuentran unidos a dicho polímero (Appendini & Hotchkiss, 2002).

En general, la actividad antimicrobiana frente a los microorganismos "*in vitro*", es superior a la que se observa en los alimentos. Así, Los componentes de éstos limitan la actividad de los agentes antimicrobianos inhibiendo la difusión desde los polímeros del material de envasado. Además, componentes del material de envasado como lubricantes, estabilizantes, etc. pueden afectar negativamente a la actividad antimicrobiana del envase bien alterando la difusión o interactuando directamente con el agente antimicrobiano. Asimismo, debe de tenerse en cuenta la concentración del agente antimicrobiano en el film, el grosor del mismo y las propiedades físicas y mecánicas del envase una vez elaborado (Appendini & Hotchkiss, 2002).

8.2. Aceites esenciales

Durante las últimas décadas se vienen investigando métodos naturales para la obtención de alimentos inocuos, siendo una de las posibilidades el empleo de aceites esenciales como agentes antimicrobianos. Los aceites esenciales están constituidos por una variedad de compuestos químicos que les proporcionan características como olor, sabor y actividad biológica. Son sintetizados por plantas y pueden obtenerse de

Introducción general

cualquier parte de la misma (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, madera, frutas o raíces). Se conocen en torno a 3000 aceites esenciales, de los que unos 300 son importantes comercialmente (Burt, 2004).

Además de su actividad frente a las bacterias, los aceites esenciales o sus componentes pueden tener propiedades antivirales, antimicóticas, antitoxigénicas, antiparasitarias e insecticidas. Estas propiedades posiblemente están relacionadas con la función que ejercen estos compuestos en las plantas.

Para la producción comercial de aceites esenciales, el método de extracción utilizado más frecuentemente es la destilación por arrastre de vapor. Por otra parte, los aceites esenciales son compuestos volátiles y por tanto, deben ser almacenados en recipientes herméticos protegidos de la luz para evitar cambios en su composición

Los aceites esenciales pueden contener hasta 60 componentes individuales. Los hay mayoritarios que pueden constituir hasta el 85% de un aceite esencial, mientras que el resto se presenta como trazas. Los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales. Existe cierta evidencia de que los compuestos minoritarios también participan en la actividad de los aceites esenciales, posiblemente por producir un efecto sinérgico de los otros componentes.

La composición de los aceites esenciales de una planta en particular puede variar en función de la zona geográfica y el momento de la cosecha. Generalmente, los aceites esenciales presentes en plantas cosechadas durante la floración o inmediatamente después poseen una mayor actividad antimicrobiana. La composición de los aceites esenciales obtenidos de diferentes órganos de una misma planta también puede variar ampliamente (Burt, 2004).

La composición del aceite esencial de orégano (OR), utilizado en este estudio, se presenta en la Tabla 0.4.

Tabla 0.4. Componentes mayoritarios del aceite esencial de orégano (Burt, 2004).

Nombre común del aceite esencial	Nombre científico de la planta de origen	Componentes mayoritarios	Composición aproximada (%) ^a
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol Timol γ-Terpineno p-cimeno	Trazas – 80% Trazas – 64% 2 – 52% Trazas – 52%

^a Porcentajes de volátiles totales

Aunque el mecanismo de acción de los aceites esenciales frente a las bacterias no está totalmente identificado, parece que no puede atribuirse específicamente a un efecto concreto sino a la acción combinada de varios. La Figura 0.8 muestra un esquema propuesto por Burt (2004). Según esta autora, el carácter lipofílico de los aceites esenciales les permite unirse a los lípidos de la membrana celular desestabilizando su estructura y aumentando su permeabilidad. Esto genera la salida de iones y otros contenidos celulares lo que origina la muerte de la bacteria sin que necesariamente se haya producido la lisis.

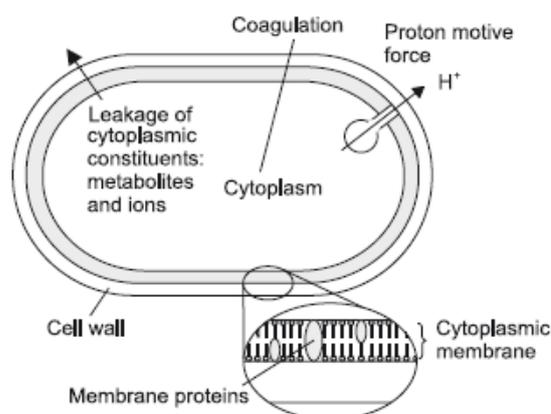


Figura 0.8. Localización y mecanismos de acción de los componentes de los aceites esenciales en la célula bacteriana (Burt, 2004).

Los aceites esenciales que poseen la máxima actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de transmisión alimentaria contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como carvacrol y timol (Figura 0.9) y se asume que actúan como el resto de compuestos fenólicos. Por tanto, se considera que sus efectos son la alteración de: la membrana citoplasmática, la fuerza protón-motriz (FPM), el flujo de

electrones y el transporte activo así como la coagulación de ciertos componentes celulares. Para carvacrol y timol y otros compuestos fenólicos se ha demostrado que la localización y la cantidad de los grupos hidroxilo están relacionadas con su toxicidad ya que una mayor oxidación está asociada con una mayor actividad bactericida. Existen otros posibles efectos inhibidores como, por ejemplo, la interacción directa con las proteínas de la membrana citoplasmática que modifica la actividad de enzimas que regulan la producción de energía o la síntesis de compuestos estructurales. Aparentemente, los componentes de ciertos aceites esenciales interactúan con las ATPasas e inhiben su actividad.

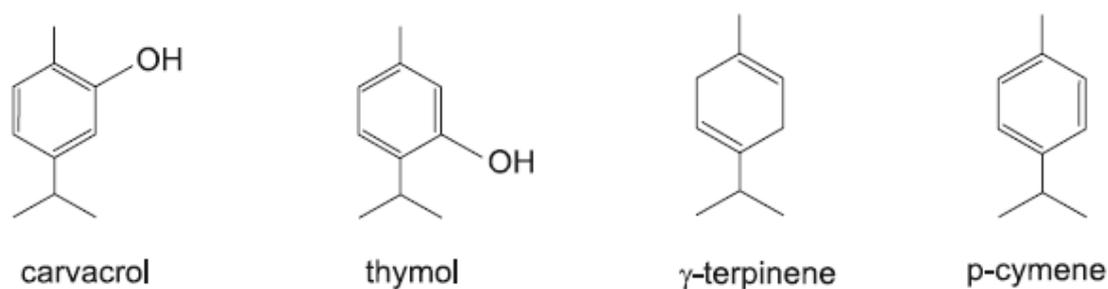


Figura 0.9. Estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de orégano (Burt, 2004).

Finalmente, los aceites esenciales son, en general, algo más activos frente a las bacterias Gram-positivas que frente a las Gram-negativas. Esto puede ser debido a la estructura de la pared celular, a la composición de la membrana externa de las bacterias y a su interacción con los aceites esenciales que, como ya se ha dicho, son de naturaleza lipofílica.

8.3. Etil Lauroil Arginato/Arginato Laurico (LAE)

El LAE (etil-N^α-lauroil-L-arginato HCL) es un agente antimicrobiano que puede utilizarse en alimentos ya que es efectivo frente a una amplia gama de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas así como frente a levaduras y mohos (Hawkins et al., 2009).

Es un tensioactivo catiónico derivado del ácido láurico y de la arginina cuya preparación y aplicación está descrita en la solicitud de la patente española ES 512643

Introducción general

A1 (García Domínguez et al., 1983) y en la de la patente Europea. La fórmula de este compuesto es $C_{20}H_{41}N_4O_3Cl$ y tiene un peso molecular de 421,03 como sal monoclóridato y de 384,57 como base libre (Rodríguez et al., 2004; Ruckman et al., 2004).

Las propiedades catiónicas de este compuesto le permiten ejercer su acción antimicrobiana alterando la pared y membranas celulares produciendo la despolarización de la membrana citoplasmática y la consecuente pérdida de componentes del citosol. En bacterias Gram-negativas las alteraciones afectan tanto a la membrana citoplasmática como a la membrana externa, mientras que en el caso de Gram-positivas las alteraciones se observan en la membrana celular y en el citoplasma. En ninguno de los casos se observa lisis celular (Rodríguez et al., 2004).

En cuanto a su metabolismo, en estudios realizados en ratas y posteriormente en personas, se observó que el LAE es rápida y completamente metabolizado. Este compuesto es hidrolizado a LAS (lauroil arginina) y luego a arginina, resultando también en la formación de ácido láurico. Una vez que se ha formado, la arginina es un constituyente normal de la dieta que es metabolizado a ornitina, urea y dióxido de carbono por las rutas normales (Figura 0.10) (Ruckman et al., 2004; Hawkins et al., 2009).

Este compuesto ha sido evaluado por la FDA (“Food and Drug Administration”) como antimicrobiano en alimentos y por el USDA (“US Department of Agriculture”) en productos cárnicos, concediéndole el estatus de GRAS (“Generally Recognised As Safe”) para niveles de hasta 225 mg/kg en categorías alimentarias específicas (Hawkins et al., 2009).

La EFSA ha realizado estudios para revisar la exposición del LAE en la población para su uso como aditivo alimentario (EFSA, 2013), aunque su uso en Europa como aditivo alimentario no está permitido de momento (https://webgate.ec.europa.eu/sanco_foods/main/index.cfm?event=substance.view&identifier=370, última visita 24 de Marzo de 2014).

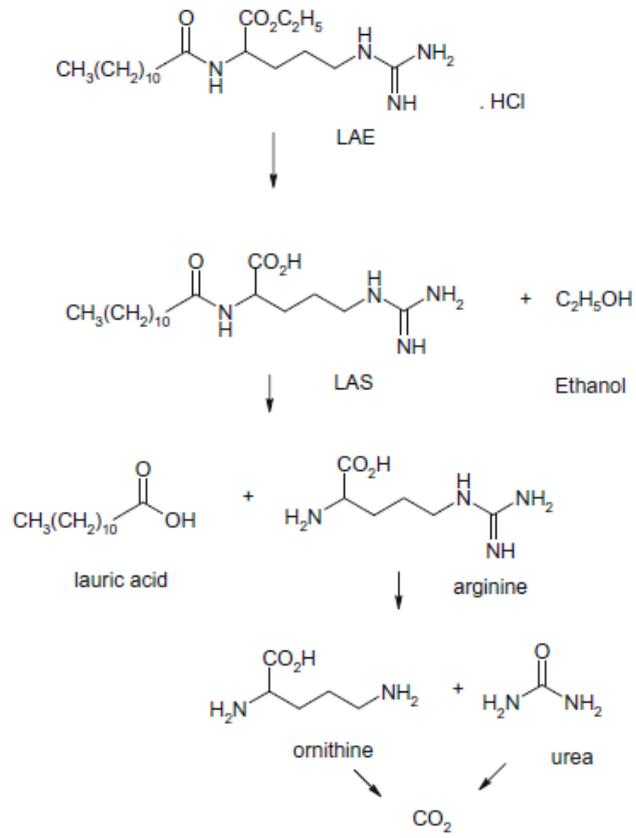


Figura 0.10. Ruta del metabolismo del LAE en mamíferos (Hawkins et al., 2009).

OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

El objetivo general de esta tesis doctoral fue conocer y mejorar la calidad de la leche de oveja producida por el Consorcio de Promoción del Ovino (CPO) y la del queso elaborado con esta leche, intentando minimizar el riesgo asociado a la presencia de cepas de *E. coli* productor de toxinas Shiga (STEC) y enteropatógenicas (EPEC).

Los objetivos concretos fueron los siguientes:

1. Conocer la importancia de la leche de oveja producida en Castilla y León como vehículo de STEC y EPEC.
2. Identificar las fuentes de contaminación de la leche con STEC y EPEC en las explotaciones de ovino, intentando establecer la relación existente entre cepas aisladas de leche de tanque, heces, agua, pienso y aire mediante el uso de técnicas moleculares.
3. Determinar si existía relación entre las cepas STEC/EPEC de origen ovino con cepas de origen humano aisladas de pacientes procedentes de la misma área geográfica.
4. Conocer el comportamiento de STEC en leche almacenada a diferentes regímenes de temperatura-tiempo y durante la fabricación y maduración de una variedad de queso de oveja tipo Zamorano.
5. Diseñar un sistema de envasado activo para controlar STEC en queso de oveja tipo Zamorano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anónimo. 2004. Reglamento (CE) Nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. D. O., L 139: 55.
2. Appendini, P. & Hotchkiss, J. H. 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3: 113-126.
3. Bergan, J., Dyve Lingelem, A. B., Simm, R., Skotland, T. and Sandvig, K. 2012. Shiga toxins. *Toxicon*, 60: 1085-1107.
4. Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A. and Fach, P. 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int. J. Food Microbiol.*, 142: 318-329.
5. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223-253.
6. Carattoli, A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.*, 32: 243-259.
7. Chen, H. D. & Frankel, G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 83-98.
8. Codex Alimentarius. 1999. Norma general del Codex para el uso de términos lecheros. CODEX STAN 206-1999.

9. Codex Alimentarius. 1978. Norma general del CODEX para el queso. Enmienda 2006, 2008. CODEX STAN 283-1978.
10. Desmarchelier, P. M., Bilge, S. S., Fegan, N., Mills, L., Vary Jr, J. C. and Tarr, P. I. 1998. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the rfb locus encoding O157 lipopolysaccharide. J. Clin. Microbiol., 36: 1801-1804.
11. Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 60: 3953-3961.
12. EFSA. 2013. Revised exposure assessment for ethyl lauroyl arginate for the proposed uses as a food additive. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3294.htm>. EFSA Journal, 11(6):3294.
13. EFSA. 2012a. Scientific Opinion on a review on the European Union Summary Reports on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009 and 2010 – specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and foodborne outbreaks. EFSA Journal, 10(6): 17-18.
14. EFSA. 2012b. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA Journal, 10(3): 161-189.
15. EFSA. 2011. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. EFSA Journal, 9: 2390.

16. Elizaquível, P., Sánchez, G. and Aznar, R. 2011. *Escherichia*. In: Liu, D. (Ed.), Molecular detection of human bacterial pathogens. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 869-879.
17. Erickson, M. C. & Doyle, M. P. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Food Prot., 70: 2426-2449.
18. FAOSTAT. 2012. Datos estadísticos de FAOSTAT. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/home/index.html>. Última visita 24 de Marzo de 2014.
19. Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K. and Govaris, A. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. Int. J. Food Microbiol., 162 (2): 190-212.
20. García Domínguez, J. J., Infante, M. R., Erra, P. and Julia, M. R. 1983. N alpha-acil-L-alkylaminoguanidinic acids and their salts as surfactants with antimicrobial action. Spanish patent, Publication number: ES 512643 A1.
21. García, E., Gago, L. and Fernández, J. L. 2006. Informe de vigilancia tecnológica. Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. Fundación para el conocimiento madri+d. CEIM.
22. Goering, R. V. 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infection, Genetics and Evolution, 10: 866-875.

23. Goering, V. R. 2004. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: Persing, D. H. e. a. (Ed.), Molecular Microbiology: Diagnostic principles and practice. ASM Press, Washington, D.C., pp. 185-196.
24. Gyles, C. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J. Anim. Sci., 85: E45-E62.
25. Han, J. H. 2005. Introduction to active food packaging technologies. In: Han, J. H. (Ed.), Innovations in food packaging. Academic Press, Londres, pp. 80-107.
26. Hanage, W. P., Feil, E. J., Brueggemann, A. B. and Spratt, B. G. 2004. Multilocus Sequence Typing: Strain characterization, populaion biology, and patterns of evolutionary descent. In: Persing, D. H. e. a. (Ed.), Molecular Microbiology: Diagnostic principles and Practice. ASM Press, Washington, D.C., pp. 235-243.
27. Hawkins, D. R., Rocabayera, X., Ruckman, S., Segret, R. and Shaw, D. 2009. Metabolism and pharmacokinetics of ethyl N α -lauroyl-L-arginate hydrochloride in human volunteers. Food and Chemical Toxicology, 47: 2711-2715.
28. Hernandez, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A. M. and Gomes, T. A. T. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett., 297: 137-149.
29. ICMSF. 2005. Microorganisms in foods: 6. Microbial ecology of food commodities. Kluwer Academic / Plenum publishers. New York.

30. Instituto de Salud Carlos III. 2010. Sistema de Información Microbiológica, Informe general 2010. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-sistema-informacion-microbiologica/Informe_General_SIM_2010.pdf.
31. Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 2: 123-140.
32. Kaspar, C., Doyle, M. E. and Archer, J. 2009. White paper on non-O157:H7 Shiga-toxin producing *E.coli* from meat and non-meat sources. Disponible en: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_NonO157STEC_4_10.pdf. Fri food safety reviews.
33. Kerry, J. P., O'grady, M. N. and Hogan, S. A. 2006. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. Meat Sci., 74: 113-130.
34. Khakhria, R., Duck, D. and Lior, H. 1990. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. Epidemiol. Infect., 105: 511-520.
35. Liu, Y., DebRoy, C. and Fratamico, P. 2007. Sequencing and analysis of the *Escherichia coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences. Mol. Cell. Probes, 21: 295-302.

36. Machado, J., Grimont, F. and Grimont, P. A. D. 2000. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. Res. Microbiol., 151: 535-546.
37. MAGRAMA. 2012. Anuario de estadística. Disponible en:
<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2012/default.aspx?parte=3&capitulo=14>. Última visita 24 de Marzo de 2014.
38. MAGRAMA. 2011. Cifras de los principales indicadores de la industria alimentaria por subsectores. Disponible en:
http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/Castilla_Leon_2011_tcm7-270409.pdf.
39. Martínez Álvarez, N. 2007. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología.
40. Michelacci, V., Tozzoli, R., Caprioli, A., Martínez, R., Scheutz, F., Grande, L., Sánchez, S. and Morabito, S. 2013. A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin. Clinical Microbiology and Infection.
41. Monday, S., Beisaw, A. and Feng, P. 2007. Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. Mol. Cell. Probes, 21: 308-311.

42. Mora, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Dhabhi, G., Echeita, A., González, E. A., Bernárdez, M. I. and Blanco, J. 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res. Microbiol.*, 156: 793-806.
43. Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J. M., Alonso, M. P., Llovo, J., Bernárdez, M. I. and Blanco, J. E. 2011. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104: H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int. Microbiol.*, 14: 121-141.
44. Nataro, P. J. & Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 142-201.
45. Olsen, J. E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P. E., Popovic, T., Rasmussen, H. N. and Olsvik, O. 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, 28: 1-78.
46. Park, Y., Juárez, M., Ramos, M. and Haenlein, G. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res.*, 68: 88-113.
47. Paton, A. W. & Paton, J. C. 2010. *Escherichia coli* subtilase cytotoxin. *Toxins*, 2: 215-228.
48. Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C. and Paton, J. C. 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of

enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.*, 69: 6999-7009.

49. Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H. and Paton, J. C. 2004. A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.*, 200: 35-46.

50. Paton, J. C. & Paton, A. W. 1998a. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11: 450-479.

51. Paton, A. W. & Paton, J. C. 1998b. 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.

52. Pennington, H. 2010. *Escherichia coli* O157. *The Lancet*, 376: 1428-1435.

53. Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. and Fach, P. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157: H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes*, 18: 185-192.

54. Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D. and 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.

55. Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I. and Chilliard, Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Res.*, 79: 57-72.
56. Rodríguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X. and Manresa, A. 2004. Cellular effects of monohydrochloride of l-arginine, N α -lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 903-912.
57. Ruckman, S. A., Rocabayera, X., Borzelleca, J. F. and Sandusky, C. B. 2004. Toxicological and metabolic investigations of the safety of N- α -Lauroyl-l-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE). *Food and Chemical Toxicology*, 42: 245-259.
58. 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. and 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.
59. Schroeder, C. M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D. G., Wagner, D. D., McDermott, P. F., Walker, R. D. and Meng, J. 2002. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 576-581.
60. Singh, P., Wani, A. A. and Saengerlaub, S. 2011. Active packaging of food products: recent trends. *Nutr. Food Sci.*, 41: 249-260.

61. Tozzoli, R., Caprioli, A., Cappannella, S., Michelacci, V., Marziano, M. L. and Morabito, S. 2010. Production of the subtilase AB5 cytotoxin by Shiga toxin-negative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 48: 178-183.
62. Trabulsi, L. R., Keller, R. and Gomes, T. A. T. 2002. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases*, 8: 508.
63. Welch, R. A. 2006. The Genus *Escherichia*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. and Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer, Singapore, pp. 60-71.



**CAPÍTULO I: Incidencia de toxinas
Shiga (Stxs), de genes *stxs* y de
dos tipos patógenos de
Escherichia coli (STEC y EPEC) en
leche de oveja y otras muestras
de origen ovino procedentes de
explotaciones de Castilla y León**

INTRODUCCIÓN

1. *E. coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC) EN LECHE

El principal reservorio de STEC son los rumiantes domésticos y silvestres, aislándose de ganado bovino, caprino y ovino y de corzos, ciervos y gamos entre otras especies. Revisiones recientes (Baylis, 2009; Kaspar et al., 2009; Farrokh et al., 2013) han puesto de manifiesto la presencia de esta bacteria en explotaciones de leche y la relación existente entre cepas de este origen y casos y brotes de infección por STEC tanto por consumo de leche cruda como por productos elaborados con leche cruda.

Las cepas de STEC que causan colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos, forman parte de la microbiota normal de los rumiantes donde se comportan, en la mayor parte de los casos, como comensales aunque se han descrito casos de diarreas en terneros recién nacidos producidas por *E. coli* O157:H7 e incluso de mamitis subclínicas (Meng et al., 2007). Su presencia en los alimentos, incluida la leche, es de origen fecal. Por tanto, el control de la higiene de los procesos y otras prácticas en establecimientos como mataderos o explotaciones lecheras es de gran importancia para minimizar el riesgo asociado a la presencia de esta bacteria en alimentos de origen animal (Kaspar et al., 2009; Farrokh et al., 2013).

La incidencia de STEC en leche cruda producida en la Unión Europea (UE) no ha variado mucho en los estudios realizados en la última década, encontrándose normalmente entre 0 y 2%. Sin embargo, el desarrollo de nuevos métodos de detección de STEC basados en técnicas moleculares, los datos obtenidos en terceros países y la búsqueda de serotipos no-O157:H7, han hecho más compleja la interpretación de los datos sobre STEC presentes en leche. Así, parece que existen variaciones geográficas en cuanto a la prevalencia de distintos serotipos y genotipos y que los pequeños rumiantes son reservorios importantes en determinadas zonas (Meng et al., 2007; Farrokh et al., 2013).

2. DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE STEC

La existencia de más de 600 serotipos de STEC (Meng et al., 2013), se refleja en la publicación de numerosos protocolos de detección y aislamiento. Existen dos

planteamientos diferentes para la detección de STEC en alimentos. Por un lado, técnicas que buscan los genes *stxs* y la producción de toxinas *Stxs* de STEC y, por otro, técnicas que detectan los serogrupos más frecuentemente asociados a la enfermedad como son: O157, O26, O45, O91, O103, O111, O121 y O145. Ambos presentan inconvenientes ya que en el primer caso es frecuente aislar cepas que no producen enfermedad y, en el segundo, pueden no detectarse serotipos patógenos “raros” (O113:H21, O174:H21) o serotipos patógenos emergentes como el O104:H4 (Farrokh et al., 2013).

Para la detección de *E. coli* O157:H7 se han desarrollado y utilizado métodos reconocidos como la norma UNE-EN ISO 16654:2001 (Anónimo, 2001), mientras que para los serogrupos no-O157, aunque se han descrito técnicas para los más frecuentes (O26, O103, O111 y O145) como las recogidas en la norma ISO/TS 13136:2012 (Anónimo, 2012), es necesario mejorarlas y, por supuesto, diseñarlas para otros serogrupos (Farrokh et al., 2013).

Para el aislamiento convencional de STEC se recurre a uno o varios de los siguientes pasos.

2.1. Enriquecimiento

En alimentos es necesario un paso previo de enriquecimiento ya que normalmente STEC está presente en un escaso número y le acompañan una gran variedad de microorganismos. Además, el enriquecimiento facilita la recuperación de bacterias lesionadas o estresadas. Se han descrito gran número de protocolos de enriquecimiento utilizando diferentes medios, agentes selectivos, temperaturas y tiempos de incubación (Vimont et al., 2006; Vimont et al., 2007; Baylis, 2008; Farrokh et al., 2013).

Para la detección de STEC tanto O157:H7 como no-O157:H7, el método de enriquecimiento más utilizado consiste en inocular la muestra en caldo TSB (Tryptone Soya Broth) con una incubación a 35-37°C durante 16-24 horas (Vimont et al., 2006). Sin embargo, para evitar el efecto competidor de la flora acompañante se ha recomendado utilizar una temperatura de incubación de 42°C, aunque esta temperatura puede interferir en la recuperación de las células dañadas (Baylis, 2008; Farrokh et al., 2013). Frecuentemente, se utilizan también agentes selectivos como telurito potásico o

antibióticos; por ejemplo, novobiocina pero se ha comprobado que su uso y el de otros agentes selectivos pueden inhibir el crecimiento de algunas cepas STEC. Por ello, algunos autores recomiendan el uso de técnicas de enriquecimiento no selectivas (Vimont et al., 2007; Farrokh et al., 2013).

2.2. Separación inmunomagnética

Tras el enriquecimiento y antes de la siembra se puede utilizar la separación inmunomagnética (SIM) para concentrar las células de STEC pertenecientes a un determinado serogrupo. El uso de SIM para O157 está muy extendido y considerado como el método estándar de detección de *E. coli* O157 en alimentos (Anónimo, 2001). Posee un límite de detección de 1-2 ufc/25g. Existen métodos SIM para la detección de STEC no-O157 como O26, O103, O111 y O145, aunque no están estandarizados (Farrokh et al., 2013).

2.3. Medios selectivos

A diferencia de la mayoría de cepas de *E. coli*, las cepas O157:H7 no fermentan el sorbitol, carecen de actividad β -glucuronidasa y son más resistentes a los compuestos cefixima y telurito. Basándose en estas propiedades se han desarrollado medios como el Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) o su modificación suplementada con Cefixima y Telurito (CT-SMAC). Existen otros medios basados en reacciones cromogénicas para la detección de *E. coli* O157:H7 pero no son útiles para la detección de otros serogrupos (Farrokh et al., 2013).

Otra característica importante es la capacidad de manifestar un tipo de hemólisis (enterohemólisis), que se utilizó para el desarrollo del medio "Enterohaemolisin Agar", preparado con eritrocitos lavados de ovino y suplementado con calcio. Tras la incubación durante 24 horas se observa una hemólisis característica (Beutin et al., 1989; Farrokh et al., 2013).

2.4. Confirmación de colonias sospechosas

Una vez obtenidos los aislados se puede confirmar que son STEC mediante varios procedimientos: el serotipado y la producción de toxinas Shiga (Stxs) o la presencia de los

genes (*stxs*) que codifican para estas toxinas. Estos métodos incluyen técnicas serológicas, ensayos en cultivos celulares y métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa – PCR- (Farrokh et al., 2013).

De forma tradicional, los aislados sospechosos eran confirmados bioquímicamente como *E. coli* y serotipados. El uso de sueros para el serotipado está restringido a laboratorios de referencia especializados y un reducido número de antígenos O y H pueden ser determinados mediante el uso de kits comerciales. Para la detección de la producción de toxinas Shiga existen kits comerciales de inmunoanálisis como el ProSpecT® Shiga Toxin (STEC) Microplate Assay (Remel, Lenexa, KS, USA). Alternativamente existen gran cantidad de genes de STEC que podemos detectar mediante PCR (*stx*, *eae*, antígenos O y H, etc.).

3. DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE *E. coli* ENTEROPATÓGENICO (EPEC)

Como en el caso de STEC no-O157, no existe un protocolo estandarizado para su aislamiento y se lleva a cabo utilizando diferentes procedimientos (Araujo et al., 2002; Cortés et al., 2005; Aidar-Ugrinovich et al., 2007; Almeida et al., 2012).

Tradicionalmente las cepas de EPEC han sido identificadas por la expresión de ciertos serotipos epidemiológicamente relacionados con diarreas en niños. Actualmente se ha visto que existen gran cantidad de cepas de EPEC pertenecientes a serotipos que no habían sido descritos hasta el momento. Además, las cepas EPEC pueden presentar genes de virulencia no asociados clásicamente con este patotipo pero presentes frecuentemente en otros tipos patógenos de *E. coli*. Por tanto, métodos fenotípicos o genotípicos basados en la presencia (o ausencia) de estas características de virulencia deben ser utilizados para la identificación de cepas EPEC (Hernandes et al., 2009).

Las cepas de EPEC se identifican por la presencia de la región LEE (donde se encuentra el gen que codifica para la intimina –*eae*-) y la ausencia de los genes que codifican para las toxinas Shiga. Los métodos genotípicos incluyen técnicas de PCR para la detección de estos genes (Hernandes et al., 2009).

OBJETIVO

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo era determinar la incidencia de las toxinas Stxs, de los genes *stxs* y de cepas STEC y EPEC en leche de oveja y, en algunos casos, en el ambiente de la explotación. También, evaluar la eficacia de un método inmunoenzimático útil en muestras clínicas para su aplicación en la detección de Stxs en leche de oveja.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. TOMA DE MUESTRAS

En el transcurso de un año (Junio 2009-Junio 2010) se tomaron muestras de leche de tanque de 388 explotaciones de ganado ovino de la Comunidad Autónoma de Castilla y León pertenecientes al Consorcio de Promoción del Ovino (CPO). Las muestras recogidas se transportaron a temperatura de refrigeración. El CPO es una cooperativa de segundo grado, la mayor del sector a nivel nacional. A esta cooperativa pertenecen explotaciones dedicadas a la cría de ganado ovino lechero principalmente de raza Assaf Española, aunque también hay rebaños de raza Castellana, Churra y Awassi. El sistema de producción es semiintensivo y la tasa reproductiva es próxima a un parto al año.

En función de los resultados obtenidos con las muestras de leche de tanque se seleccionaron diez explotaciones positivas de STEC, una de cada una de las rutas de recogida, con el fin de realizar una segunda toma de muestras. Esta vez consistió en dos muestreos en diferentes estaciones del año: el primero en Mayo del año 2011 (muestreo de primavera) y el segundo en Septiembre de este mismo año (muestreo de verano). Las muestras tomadas y el método utilizado se describen a continuación:

- Aire: se utilizó el muestreador de aire “Air Sampler RCS Plus” (Biotest Hycon, Dreieich, Alemania), recogiendo diez litros de aire en cada uno de los establos de las explotaciones.
- Agua: se tomaron muestras del agua de bebida de los animales (500 ml) en recipientes de vidrio previamente esterilizados.
- Pienso: utilizando bolsas estériles desechables se tomaron muestras del alimento de los animales.
- Heces: mediante el uso del calcetín estéril para recogida de muestras fecales Sterisox (Sodibox Pont C’hoat, Nevez, Francia) se muestrearon las heces de los animales. Se utilizaron dos pares de calcetines por explotación, se dieron al menos cien pasos por cada par de calcetines muestreando los diferentes sectores de la granja (en especial la zona de descanso, ya que es el lugar en el que se acumula mayor cantidad de deposiciones). Los calcetines fueron previamente humedecidas con una solución estéril compuesta por 0,8% de

cloruro sódico (Panreac Química, S.L.U., Barcelona, España) y 0,1% de agua de peptona (Oxoid, Basingstoke, UK). Una vez terminado el muestreo, con cuidado de no desprender el material adherido, se depositaron los calcetines en bolsas estériles convenientemente etiquetadas.

Al igual que en el caso de las muestras de leche de tanque, todas estas se transportaron al laboratorio a temperatura de refrigeración.

2. ENRIQUECIMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se realizó un enriquecimiento de todas las muestras tomadas. Para ello se utilizó el medio líquido Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) al que se añadió 0,6% de Yeast Extract (YE, Oxoid), incubándose a 42°C durante 18 horas (Vimont et al., 2006; Vimont et al., 2007; Baylis, 2008). El procedimiento con los distintos tipos de muestras fue el siguiente:

- Leche de tanque: se mezclaron 50 ml de la muestra de leche con 450 ml del medio de enriquecimiento.
- Aire: las muestras de aire fueron tomadas en tiras del medio general Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid). Se mezcló cada una de las tiras de TSA (Oxoid) con 50 ml del medio de enriquecimiento y se homogeneizó en un BagMixer-400 blender (InterScience, Saint-Nom-la-Bretèche, Francia) durante un minuto y medio para su posterior incubación.
- Agua: Se filtraron 250 ml del agua de bebida de cada una de las granjas a través de filtros de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm (Pall Corporation, MI, USA). Se introdujeron los filtros en 50 ml de la solución de enriquecimiento y se homogeneizó durante un minuto y medio.
- Pienso: se pesaron 25 g de pienso que se añadieron a 225 ml del caldo de enriquecimiento y se homogeneizó durante minuto y medio.
- Heces: se desembalaron cuidadosamente los calcetines para no desprender el material fecal. Los cuatro calcetines pertenecientes a una misma explotación se sumergieron en 225 ml de la solución de enriquecimiento y se homogeneizó durante un minuto y medio.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (18 horas) se llevaron a cabo una serie de pruebas que se describen a continuación.

3. DETECCIÓN DE TOXINAS Stx1 Y Stx2 EN LECHE DE OVEJA

Para la detección de las toxinas en leche se utilizó el método ProSpecT® Shiga Toxin (STEC) Microplate Assay (Remel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta prueba es un inmunoanálisis en fase sólida que permite la detección de Stx1 y Stx2 en muestras de heces o en cultivos fecales enriquecidos. Las muestras se añaden a los pocillos de la microplaca a los que se encuentra ligado el anticuerpo policlonal de conejo antitoxinas Shiga 1 y 2. Si hay toxina en la muestra, ésta es “capturada” por el anticuerpo ligado. Los pocillos se incuban y posteriormente se lavan para eliminar el material no ligado. Se añade el conjugado enzimático (anticuerpo monoclonal antitoxinas Shiga 1 y 2 marcado con enzima peroxidasa de rábano). Los pocillos se incuban y posteriormente se lavan para eliminar el conjugado enzimático no ligado. Si la reacción es positiva, la toxina liga el conjugado enzimático al pocillo. Finalmente se añade el sustrato para la enzima, tetrametilbencidina (TMB). Si la reacción es positiva aparecerá un producto de reacción coloreado que se puede detectar visualmente o mediante una lectura espectrofotométrica midiendo la densidad óptica (D.O.) a longitudes de onda de 450 o 630-650 nm. Se realizaron las lecturas con un espectrofotómetro Multiskan FC microplate (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Se eligió la lectura de los resultados a 450 nm y se interpretaron así: Positivo: D.O. > 0,150; Negativo: D.O. < 0,100; Dudoso: D.O. entre 0,100-0,150.

Como pruebas control, se inoculó leche de oveja pasteurizada y sin pasteurizar con diferentes niveles de la cepa de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) *E. coli* O157:H7 CECT 4076 (1, 10 y 10⁵ ufc/ml). Posteriormente se sometieron al enriquecimiento mencionado y en cada muestra se investigó la presencia de Stx1 y Stx2. Paralelamente, se investigó la presencia de las toxinas en muestras de leche de tanque de 130 explotaciones pertenecientes al CPO.

4. DETECCIÓN DE LOS GENES *stx1* y *stx2* EN LOS ENRIQUECIMIENTOS

Tanto con las muestras correspondientes al enriquecimiento de leche de tanque como en aquellas procedentes del aire, el agua, el pienso y las heces se llevó a cabo una

técnica de PCR para la detección de los genes que codifican para las toxinas Shiga. Para ello se tomaba 1 ml de cada uno de los enriquecimientos y se centrifugaba (13.000 g durante 3 minutos) para obtener un “pellet” o sedimento. A continuación éste se resuspendía en Phosphate buffered saline (PBS, Oxoid) y se volvía a centrifugar descartando el sobrenadante. Este lavado se hacía dos veces, y finalmente se resuspendía el “pellet” resultante en una solución acuosa que, en el caso de los enriquecimientos de la leche, contenía Tritón X-100 (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España) al 1% y Chelex® 100 Resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) al 2%. El Tritón actúa como detergente y el Chelex® como quelante de los iones de calcio presentes en la leche. Para la extracción del ADN las muestras se sometieron a un tratamiento de 100°C durante 15 minutos.

Finalmente se realizó una PCR múltiple para detectar los genes *stx1* y *stx2* utilizando los cebadores a una concentración de 250 nM (Paton & Paton, 1998b) (Tabla I.1). La amplificación de estos genes se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con las condiciones que se detallan a continuación y se muestran en la Figura I.1. Se realizó una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos seguida de 30 ciclos compuestos por, una desnaturalización a 92°C durante 30 segundos, una hibridación a 61°C durante 30 segundos y una elongación a 72°C durante 1 minuto, para terminar con una elongación final a 72°C durante 1,5 minutos.

El producto de la PCR fue sometido a una electroforesis en un gel de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España) al 1,5% en Tris-Acetic Acid-EDTA (TAE, Laboratorios Conda) y posteriormente para su revelado se sumergió en una solución con 10 mg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Química) y se observaron los resultados exponiendo el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories). 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 múltiple para la detección de los genes *stx1* y *stx2* en los enriquecimientos de las muestras.

Diana	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb) ^a	Referencia
<i>stx1</i>	Stx1F	ATAAATTGCCATTCGTTGACTAC	180	(Paton & Paton, 1998b)
	Stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<i>stx2</i>	Stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	
	Stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		

^apb: Pares de bases

5. OBTENCIÓN DE AISLADOS DE ORIGEN OVINO

Se obtuvieron aislados procedentes de leche de tanque, aire, agua, pienso y heces en explotaciones del CPO. Para ello, y teniendo en cuenta que la PCR no tiene un 100% de fiabilidad, se sembraron todos los enriquecimientos (tanto los que resultaron positivos para los genes que codifican para las toxinas Shiga como los que resultaron negativos) en dos medios diferentes.

- CT-SMAC (Sorbitol MacConkey Agar suplementado con Cefixima y Telurito, Oxoid). Esta bacteria normalmente no fermenta el sorbitol, por lo que produce colonias incoloras, mientras que otras *E. coli* no-O157:H7 generalmente si fermentan el sorbitol, por lo que darán lugar a colonias de color rosa. Se observaron estas placas tras su incubación a 37°C durante 24 horas.
- “Enterohaemolysin Agar” (Beutin et al., 1989): Las placas se examinaron tras incubar a 37°C durante 4 horas y después de transcurridas otras 20 horas. Cuando aparece hemólisis a las 4 horas de incubación se trata de una α -hemolisina, y si la hemólisis aparece tras 24 horas de incubación se trata de una enterohemolisina. Por tanto se aislaron las colonias que presentaban hemólisis únicamente tras 24 horas de incubación. Estas se inocularon en CT-SMAC para comprobar que mostraban la morfología característica de *E. coli* en este medio.

Las colonias obtenidas en estos medios se sometieron a pruebas de PCR buscando los genes que codifican para las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*) y el gen que codifica para la intimina (*eae*) (Paton & Paton, 1998b) (Tabla I.2).

Tabla I.2. Cebadores utilizados en la técnica de PCR múltiple para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* en las cepas aisladas.

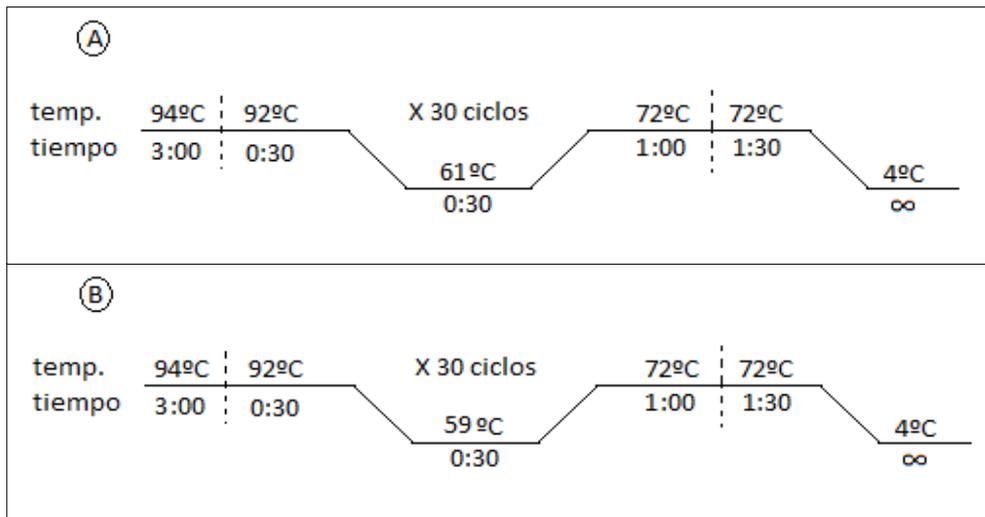
Diana	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb) ^a	Referencia
<i>stx1</i>	Stx1F	ATAAATTGCCATTCGTTGACTAC	180	(Paton & Paton, 1998b)
	Stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<i>stx2</i>	Stx2F	GCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	
	Stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>eae</i>	eaeF	GACCCGGCACAAGCATAA	384	
	eaeR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		

^apb: Pares de bases

Los aislados que presentan uno o los dos genes que codifican para las toxinas Shiga se incluyeron en el grupo de *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC) con o sin la presencia del gen *eae*, mientras que los que sólo presentaban el gen que codifica para la intimina, se consideraron *E. coli* enteropatógenicos (EPEC).

La amplificación de estos genes se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf) con las condiciones para la PCR que aparecen detalladas en la Figura I.1. Se reveló el producto de PCR tal y como se ha descrito anteriormente.

Los aislados positivos para uno o varios genes se sembraron en TSA (Oxoid) incubando las placas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se recogió cantidad suficiente de crecimiento y se guardó a -40 °C en Nutrient Broth (NB, Oxoid) con un 40% de Glicerol (Acofarma, Barcelona, España) para su posterior caracterización.



Genes *stx1* y *stx2* (A). Gen *eae* (B).

Figura I.1. Condiciones de la PCR para la amplificación de los genes presentes en los aislados.

RESULTADOS

1. DETECCIÓN DE TOXINAS Stx1 Y Stx2 EN LECHE DE OVEJA

En las pruebas control realizadas con el test inmunológico ProSpecT® Shiga Toxin (STEC) Microplate Assay en leche inoculada con la cepa de colección (CECT 4076) se obtuvieron resultados diferentes en función de si la leche había recibido o no un tratamiento de pasteurización y de los niveles a los que se inoculó la cepa.

Tras el enriquecimiento, en las muestras de leche de oveja pasteurizada inoculadas con 1, 10 y 10^5 ufc/ml de la cepa de colección, el test inmunológico dio un resultado positivo para las toxinas Shiga en todos los casos (Figura I.2). Sin embargo, en muestras de leche cruda inoculada y sometida al mismo enriquecimiento, el test solo detectó las toxinas Shiga cuando la concentración inicial de la cepa STEC en la muestra era del orden de 10^5 ufc/ml (Tabla I. 3).

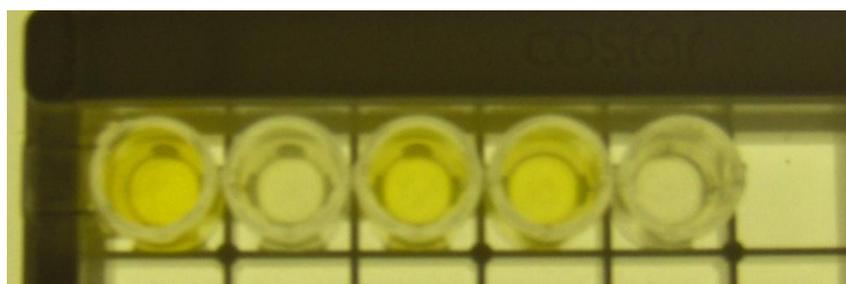


Figura I.2. Prueba del test inmunológico en muestras de leche pasteurizada inoculada con una cepa de colección (*E. coli* CECT 4076). De izquierda a derecha: positivo del test, negativo del test, leche pasteurizada inoculada con 10 ufc/ml, leche pasteurizada inoculada con 1 ufc/ml y leche sin inocular.

Tabla I.3. Medidas de absorbancia (D.O.)^a obtenidas tras la utilización del test inmunológico en leche cruda de oveja inoculada con la cepa de colección *E. coli* CECT 4076.

λ	Control +	Control -	Leche sin inocular	Leche inoculada		
				10^5 ufc/ml	10 ufc/ml	1 ufc/ml
450nm^b	2,124	0,065	0,058	1,234	0,063	0,064

^aD.O.: Densidad óptica

^bPositivo (+): D.O. > 0,150; Negativo (-): D.O. < 0,100; Dudoso: D.O. entre 0,100-0,150.

Ni la toxina Stx1 ni la Stx2 se detectaron en las 130 muestras de leche de tanque analizadas.

2. DETECCIÓN DE LOS GENES *stx1* Y *stx2* EN LOS ENRIQUECIMIENTOS

De un total de 388 muestras de leche de tanque de otras tantas explotaciones, un 45,4% (176) resultó positivo para uno o los dos genes que codifican para las toxinas Shiga (Tabla I.4 y Figura I.3).

Tabla I.4. Incidencia de los genes *stx1* y *stx2* en muestras de leche de tanque de 388 explotaciones.

Nº de muestras	Positivas <i>stxs</i>	Genotipo		
		<i>stx1+</i>	<i>stx2+</i>	<i>stx1+/stx2+</i>
388	176 (45,4%)	35 (9%)	39 (10,1%)	102 (26,3%)

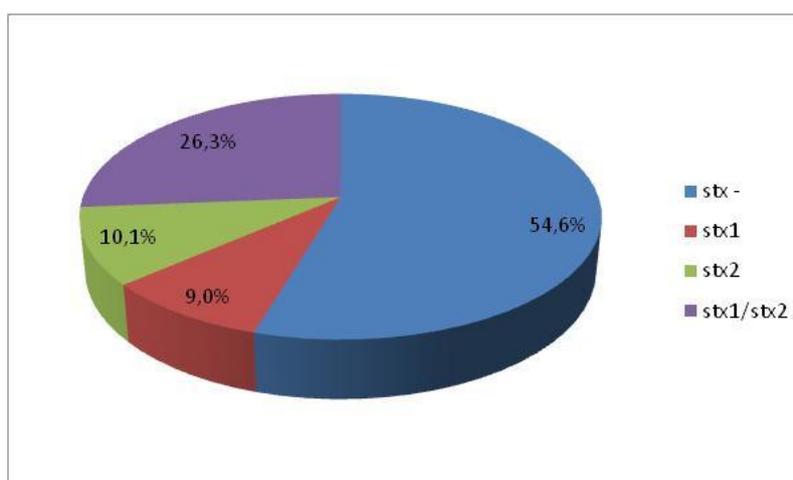


Figura I.3. Distribución de las 388 muestras de leche de tanque en función de la presencia de los genes *stxs*.

En las diez explotaciones en las que se realizaron muestreos de aire, agua, pienso y heces de ovino durante dos estaciones (primavera y verano) se detectaron genes *stxs* sólo en muestras procedentes de agua y de heces. Nueve (45%) de las 20 muestras de agua resultaron positivas para los genes *stxs*; ocho de ellas (40%) para el gen *stx2* y una (5%) para ambos genes (*stx1* y *stx2*). Cinco (25%) muestras de heces resultaron positivas para *stx2*. Estos datos se presentan en la Tabla I.5.

Tabla I.5. Incidencia de los genes *stx1* y *stx2* en muestras de agua y en heces de ovino.

Estación	Tipo de muestra	Nº de muestras	Positivas <i>stxs</i>	Genotipo		
				<i>stx1</i> +	<i>stx2</i> +	<i>stx1</i> +/ <i>stx2</i> +
Primavera	Agua	10	4 (40%)	0	3 (30%)	1 (10%)
	Heces	10	2 (20%)	0	2 (20%)	0
Verano	Agua	10	5 (50%)	0	5 (50%)	0
	Heces	10	3 (30%)	0	3 (30%)	0

3. OBTENCIÓN DE AISLADOS DE ORIGEN OVINO

El número total de cepas STEC y EPEC aisladas fue de 134. De las 388 muestras de leche de tanque se obtuvieron 112 cepas. De ellas, 50 presentaban uno o los dos genes *stxs*, con o sin la presencia del gen *eae*, por lo que fueron clasificadas como STEC. De las muestras de leche de tanque, se obtuvieron también un total de 62 cepas que poseían el gen *eae* sin presentar ninguno de los genes *stxs*, es decir cepas EPEC. Siguiendo el mismo criterio; de las heces, se aislaron 10 cepas del grupo STEC y cuatro del EPEC. Del agua, dos STEC y cinco EPEC y del aire, sólo una EPEC. En las muestras de pienso no se detectaron cepas STEC ni EPEC. Estos datos y los genotipos hallados se presentan en la Tabla I.6 y en la Figura I.4.

Tabla I.6. Incidencia de los diferentes genotipos en las 134 cepas de origen ovino aisladas de leche, heces, agua y aire.

Origen	Número de cepas	STEC				EPEC
		<i>stx1</i> +	<i>stx1</i> +/ <i>stx2</i> +	<i>stx1</i> +/ <i>eae</i> +	<i>stx2</i> +/ <i>eae</i> +	<i>eae</i> +
Leche	112	35 (31,2%)	10 (8,9%)	2 (1,8%)	3 (2,7%)	62 (55,4%)
Heces	14	9 (64,3%)	1 (7,1%)	0	0	4 (28,6%)
Agua	7	1 (14,3%)	0	0	1 (14,3%)	5 (71,4%)
Aire	1	0	0	0	0	1 (100%)
Total	134	45 (33,6%)	11 (8,2%)	2 (1,5%)	4 (3%)	72 (53,7%)

Considerando todas las explotaciones y todas las muestras analizadas tanto de leche como de agua, heces, aire y pienso, se obtuvieron aislados de STEC en 34 explotaciones (8,8%) y de EPEC en 55 explotaciones (14,2%). Cinco cepas STEC fueron aisladas de muestras de leche de cuatro explotaciones en las que el enriquecimiento había resultado negativo a la presencia de los genes *stxs*. En el caso de las muestras ambientales

(aire, agua, heces y pienso), se aislaron 22 cepas (11 en primavera y 11 en verano). De ellas, 12 (54,5%) (obtenidas la mitad en primavera y la mitad en verano) poseían uno o los dos genes *stx*s y 10 (45,5%) (obtenidas la mitad en primavera y la mitad en verano) poseían únicamente el gen *eae*. En una explotación se obtuvieron aislamientos STEC en muestras de agua y heces en el muestreo de verano, y tres explotaciones resultaron positivas para el aislamiento de STEC en heces en ambos muestreos (primavera y verano). Por otro lado, en una explotación en el muestreo de verano y en dos en el de primavera, se obtuvieron aislamientos EPEC en muestras de agua y heces. Además se obtuvieron aislamientos en heces y aire en una misma explotación en el muestreo de verano. Una explotación resultó positiva para el aislamiento de EPEC en agua en ambos muestreos (primavera y verano).

La Figura I.4A presenta la distribución de todas las cepas aisladas (STEC y EPEC) en función de su origen y en la Figura I.4B se muestra la distribución de los genotipos de todas las cepas aisladas (STEC y EPEC).

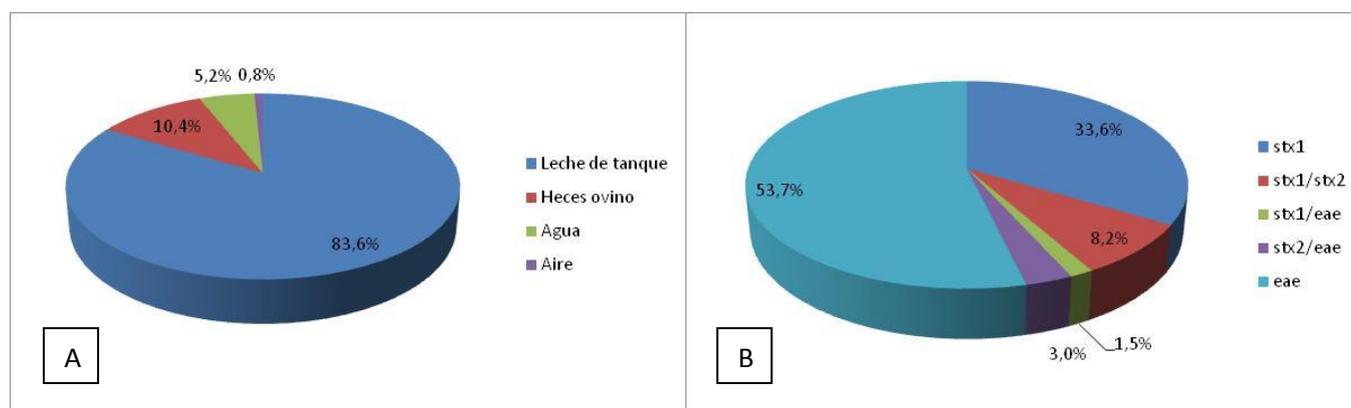


Figura I.4. Distribución de todas las cepas aisladas (STEC y EPEC) en función de su origen (A) y de sus genotipos (B).

Finalmente, la Tabla I.7 presenta las notas de auditoría durante los años 2009 y 2010 de algunas de las explotaciones en las que se aislaron cepas STEC tanto de leche como del medio ambiente (Otero, 2013). Para el cálculo de estas notas en las auditorías se valoraron diferentes aspectos (nota sobre una escala de 100), al área crítica de Sanidad animal le corresponde un 30% de la nota final, a la de Higiene del ordeño también un 30%, y a las cuatro restantes (Agua y alimentación, Bienestar animal, Medio ambiente, y Formación y registro) un 10% a cada una.

Tabla I.7. Notas de auditoría en explotaciones en las que se obtuvieron aislados STEC a partir de muestras de leche y/o ambientales (Otero, 2013).

ORIGEN DEL AISLADO STEC	NOTAS DE AUDITORÍA ^a	
	2009	2010
Leche	87.3 (Máxima) ^b	25 (Inhibidores)
Leche	80.0 (Máxima)	82.0 (Máxima)
Leche	25 (Agua de pozo) ^c	83.7 (Máxima)
Agua		
Heces	25 (Inhibidores)	25 (Inhibidores)
Leche		
Leche	86.8 (Máxima)	88.6 (Máxima)
Leche	67.2 (Alta)	Cesó actividad
Leche	58.0 (Alta)	25 (Bacteriología: > 500)
Leche	85.2 (Máxima)	87.7 (Máxima)
Leche		
Heces	25 (Aguados + Agua de pozo + Bacteriología: 420)	25 (Inhibidores + Agua de pozo + Bacteriología: 450)
Heces		
Leche	25 (Inhibidores)	25 (Inhibidores + Aguados)
Leche	86.7 (Máxima)	86.7 (Máxima)
Leche	25 (Inhibidores)	68.2 (Alta)
Leche	25 (Agua de pozo)	25 (Agua de pozo)
Leche	91.7 (Máxima)	89.1 (Máxima)
Leche	25 (Inhibidores)	74.9 (Alta)
Leche	82.6 (Máxima)	25 (Inhibidores)
Leche		
Heces		
Heces	85.2 (Máxima)	83.1 (Máxima)
Heces		
Leche	25 (inhibidores)	78.8 (Máxima)
Leche	25 (aguados)	73.3 (Alta)
Leche		
Leche	83.5 (Máxima)	85.0 (Máxima)
Agua		
Leche	82.3 (Máxima)	81.0 (Máxima)
Leche	25 (Inhibidores)	25 (Inhibidores)
Leche	84.3 (Máxima)	84.3 (Máxima)
Leche		
Leche	25 (Inhibidores + Bacteriología: > 500)	25 (Inhibidores)
Heces		
Heces		
Leche	25 (Aguados)	25 (Aguados)
Leche	25 (Bacteriología: > 500)	25 (Bacteriología: 1259)
Leche		
Heces	79.7 (Máxima)	25 (Aguados)
Leche	86.3 (Máxima)	25 (inhibidores)
Leche		
Leche	79.2 (Máxima)	25 (Inhibidores)
Leche		
Leche	25 (Inhibidores)	86.8 (Máxima)
Leche	-	76.0 (Máxima)
Leche	-	25 (Inhibidores)

^a Copia del documento proporcionado por el CPO

^b Las notas de auditoría son sobre 100: La Nota 25 supone una seguridad comprometida por la causa que se indica.

^c En el caso de "agua de pozo" se refiere a que en ese año, el ganadero no tenía certificado de potabilidad del agua usada en la explotación.

DISCUSIÓN

1. DETECCIÓN DE TOXINAS Stx1 Y Stx2 EN LECHE DE OVEJA

Los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) para la detección de toxinas Stxs son de gran utilidad en muestras clínicas ya que permiten detectar su presencia y posteriormente confirmar la de cepas STEC en heces de pacientes, bien directamente o tras un periodo de enriquecimiento (Gavin et al., 2004). Entre estos EIA destacan tres: el sistema Premier EHEC test (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH, USA), el sistema Duopath® Verotoxins Gold Labelled Immuno Sorbent Assay (GLISA) (Merck, Alemania) y el sistema utilizado en este trabajo (ProSpecT® Shiga Toxin (STEC) Microplate Assay). Acheson et al. (1996) estudiaron la eficacia del primero de estos métodos EIA en leche y carne picada de vacuno sometidos a un enriquecimiento previo, concluyendo que, en ambos alimentos, tanto inoculados como sin inocular, permitía detectar toxinas asociadas a la presencia inicial de niveles muy bajos de células pertenecientes a diversos serogrupos de STEC.

El Ministerio de Sanidad de Canadá (“Health Canada”) que es responsable del control de la inocuidad de los alimentos y del etiquetado relativo a la inocuidad y a los aspectos nutricionales de los mismos (“Food & Nutrition”) contempla la utilización de los sistemas Premier EHEC test y Duopath para la detección de Stxs en alimentos y/o sus ingredientes con el fin de comprobar si cumplen los requisitos legales recogidos en la Ley sobre Productos Alimenticios y Farmacéuticos (“Food and Drug Acts”) (“Health Canada Laboratory procedure MFLP-83 y Health Canada Laboratory procedure MFLP-93”) (disponibles en <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume3-eng.php>, última visita 28 de Marzo de 2014).

La sensibilidad y especificidad del método empleado por nosotros (ProSpecT® Shiga Toxin (STEC) Microplate Assay) han sido investigadas en heces de pacientes (Gavin et al., 2004), observándose una sensibilidad y especificidad del 100% para la detección de *E. coli* O157 y del 93% para la presencia de cepas O157 y no-O157 pero, hasta ahora, su utilidad para muestras de alimentos no había sido investigada.

En este estudio, en las muestras de leche pasteurizada y posteriormente inoculada con diferentes niveles de la cepa CECT 4076, el resultado con el método ProSpecT® fue

siempre positivo, mientras que para la leche cruda, solo se obtuvieron resultados positivos cuando se inocularon niveles altos de la cepa CECT 4076 (10^5 ufc/ml). Además, ninguna de las muestras de leche de tanque sometidas a esta prueba resultó positiva. Estos datos sugieren que la flora propia de la leche influye en la producción de Stxs por parte de STEC. Otros microorganismos y quizás algunos compuestos antimicrobianos (termolábiles) naturalmente presentes en la leche de oveja podrían haber inhibido el crecimiento de la cepa STEC y/o la producción de estas toxinas. Por tanto, no parece que el método ProSpecT® sea útil para la detección de las toxinas Stxs en leche de oveja.

Willford et al. (2009) compararon tres métodos EIA: sistemas ProSpecT®, Premier EHEC test y Ridascreen Verotoxin Enzyme Immunoassay (r-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania). Todos fueron capaces de detectar la presencia de Stxs en 67 de las 70 muestras de cultivos puros de cepas de *E. coli* que presentaban uno o más de los genes que codifican para estas toxinas. Los autores sugirieron que la no detección de Stxs en tres muestras inoculadas podría deberse a la presencia de subtipos de Stxs que estos EIA no pueden detectar (Stx2d y Stx2e en los tres sistemas y, además, Stx1d en el caso del sistema Ridascreen). De hecho existe otro estudio (Feng et al., 2011) en el que se amplían los subtipos de estas toxinas que el ProSpecT® no puede detectar (Stx1c, Stx2b, Stx2c, Stx2e, Stx2f y Stx2g), aunque estos autores concluyen que estos datos deben tomarse con precaución, ya que varían de una cepa a otra debido a la escasa o nula expresión de toxinas Stxs, por lo que los EIA deberían combinarse con otros métodos. Por otra parte, hay que señalar que el método ProSpecT® detectó como positiva una de las muestras control que no contenía ninguno de los genes que codifican para las toxinas Shiga. Los tres sistemas EIA necesitaban niveles altos de células de STEC para poder detectar las toxinas; así, los métodos ProSpecT® y Premier EHEC las detectaban cuando éstos eran de 10^6 ufc/ml y para el método Ridascreen era preciso 10^7 ufc/ml. En leche y otros alimentos no se encuentran concentraciones elevadas de STEC pero estos mismos autores (Willford et al., 2009) han demostrado, en medios de cultivo, que utilizando técnicas de enriquecimiento, los niveles iniciales bajos alcanzan, al llegar la fase estacionaria la concentración de células necesaria para que en el medio se encuentren niveles detectables de toxinas Stxs. Un hallazgo interesante del trabajo de Willford et al. (2009) es el hecho de que al utilizar uno de estos sistemas (Premier EHEC test) para detectar Stxs en heces de bovino inoculadas, la

sensibilidad disminuyó, al menos diez veces. Este hecho, probablemente debido a las propias heces y su flora, podría, al menos en parte, explicar el comportamiento de nuestras cepas en leche cruda.

Por tanto, la no detección de las toxinas Stxs en nuestras muestras de leche pudo deberse a diversos factores. En primer lugar la propia cepa puede poseer los genes que codifican para las toxinas Stxs y no producirlas, por otro lado puede que las toxinas Stxs se encuentren en el medio pero pertenezcan a un subtipo no detectado por el test. Finalmente la leche y su flora podrían inhibir la producción de toxinas por parte de las cepas STEC y tampoco se detectarían.

2. DETECCIÓN DE LOS GENES *stx1* Y *stx2* Y OBTENCIÓN DE AISLADOS EN LOS ENRIQUECIMIENTOS DE ORIGEN OVINO

En este estudio, un elevado porcentaje de las muestras de leche (45,4%) resultaron positivas a uno o los dos genes que codifican para las toxinas Shiga. En estudios previos dedicados a la determinación cualitativa (PCR) de genes de STEC en leche de pequeños rumiantes se obtuvieron porcentajes notablemente inferiores. Así, en Suiza, Muehlherr et al. (2003) encontraron que las muestras *stxs* positivas para leche de tanque tanto de oveja como de cabra fueron del 23,8 y 23%, respectivamente y D'Amico et al. (2008), en los Estados Unidos de América (USA) no encontraron muestras positivas en leche de oveja y sólo un 0,75% en leche de cabra. El análisis de los datos publicados debe de hacerse teniendo en cuenta aspectos tales como las diferencias en el método de muestreo, los métodos analíticos utilizados, las especies animales e incluso las épocas de muestreo. Hay que considerar que en la mayoría de los estudios sólo se investiga la presencia de *E. coli* O157 y que son escasos aquellos dedicados a la búsqueda de otros serogrupos (Farrokh et al., 2013).

Entre las muestras ambientales, el porcentaje de muestras positivas de genes que codifican para las Stxs en los enriquecimientos de heces de 10 explotaciones fue del 20% en primavera y del 30% en verano. En los enriquecimientos de agua de bebida de esas mismas explotaciones, la incidencia de muestras *stxs* positivas fue del 40% en primavera y 50% en verano. Como ya se ha indicado, en las muestras de aire y pienso no se detectaron *stxs*. Es preciso recordar que las muestras ambientales (heces, agua, pienso y aire) se

tomaron, en primavera y verano, en 10 explotaciones en las que la leche de tanque había sido positiva para STEC. No existe información acerca de la presencia de *stxs* en heces de ovino aunque si existe acerca de la incidencia de STEC en rebaños. Así, Blanco et al. (2003) estudiaron, en Extremadura, muestras rectales de ovejas de 93 explotaciones, encontrando animales portadores en el 68% de ellas. Este porcentaje contrasta con lo encontrado en nuestro estudio, en el que únicamente el 25% de las muestras de heces de las explotaciones muestreadas resultaron positivas para alguno de los genes *stxs*. Esta diferencia puede deberse al método de muestreo utilizado (muestras rectales frente al uso de calcetines para toma de muestras de heces del suelo).

El agua de bebida, al igual que las heces de animales infectados, también puede transmitir STEC en el rebaño, probablemente debido a la contaminación con heces de forma directa o indirecta, pudiendo actuar como reservorio de este microorganismo y vehículo de infección para los animales (LeJeune et al., 2001; Berry & Wells, 2010). Los piensos, antes de la exposición a los animales, no se consideran un vehículo de transmisión de STEC, aunque puede darse contaminación durante la alimentación (Berry & Wells, 2010). En nuestro estudio las muestras de pienso se tomaron antes de su distribución en los comederos, lo que explica que no se detectaran genes *stxs*. Además parece que el aire no es un vehículo adecuado para la transmisión de STEC en las explotaciones de ovino.

Las muestras de leche de 34 explotaciones resultaron positivas para el aislamiento de cepas STEC, obteniendo un total de 50 aislados. La tasa de aislamiento (8,8% de las muestras de leche de tanque) fue superior a la mayoría de los hallados en trabajos previos en los que oscilaban entre 1 y 8,3% (Dontorou et al., 2003; Muehlherr et al., 2003; Caro et al., 2006; Rey et al., 2006; D'Amico et al., 2008; Solomakos et al., 2009; Martin & Beutin, 2011). Únicamente, en un estudio realizado también en Castilla y León con muestras de leche almacenada en fábrica (Caro et al., 2011), se encontró una incidencia mayor a la obtenida por nosotros ya que de un total de 159 muestras de leche, se aislaron cepas STEC pertenecientes a tres serotipos diferentes, siendo su incidencia: O157 (18,2%), O11 (8,2%) y O26 (5,7%). Los valores obtenidos en este estudio muestran mayores tasas de prevalencia y aislamiento de STEC en leche de oveja, lo que podría estar relacionado con el procedimiento de enriquecimiento empleado, sin ningún antibiótico y con una temperatura de 42°C. Algunos de los estudios realizados en leche de ovino utilizaban

enriquecimientos suplementados con novobiocina y una temperatura de 37°C, lo que se ha visto que inhibe a algunas cepas STEC (Vimont et al., 2006).

El aislamiento de cinco cepas STEC de muestras de leche de cuatro explotaciones en las que el enriquecimiento había resultado negativo a la presencia de los genes *stxs* puede explicarse por la sensibilidad de la PCR. Esta sensibilidad se ha visto aumentada en gran medida en muestras de heces y alimento al realizar un enriquecimiento previo de estas muestras. Con el enriquecimiento se consigue por un lado diluir los inhibidores que pudieran estar presentes en la muestra, y por otro aumentar el número de copias de la secuencia diana al aumentar el crecimiento bacteriano, quizás en estos casos el enriquecimiento de la muestra no fue suficiente (Paton & Paton, 1998a).

En el caso de EPEC, se aislaron cepas en 55 explotaciones (14,2% de las muestras de leche de tanque), obteniéndose un total de 62 aislados. No hemos encontrado publicaciones relativas a la prevalencia de este tipo patógeno de *E. coli* en leche de oveja, aunque sí en quesos elaborados con leche cruda de oveja así como en leche de otras especies. En un trabajo realizado con quesos de oveja, se aislaron 95 cepas de *E. coli* de las cuales el 3,09% fue adscrito a EPEC (Holko et al., 2006). Los porcentajes encontrados en leche de otras especies (yak, cabra y vaca) son inferiores a los hallados por nosotros, oscilando entre el 0 y el 7,7% (Silva et al., 2001; Cortés et al., 2005; Bandyopadhyay et al., 2012).

Por lo que respecta a STEC en las muestras ambientales, sólo se aislaron cepas de este tipo en algunas de las explotaciones muestreadas; a pesar de que la leche de tanque de todas ellas contenía cepas STEC. Las 12 cepas aisladas procedían mayoritariamente de heces (10) y, en menor medida de agua (2). Nuestros resultados indican que, como en heces humanas, la presencia de *stxs* en heces de ovino tiene una mayor correlación con el aislamiento de STEC. Aunque el sistema EIA utilizado podría ser útil para detectar explotaciones positivas de STEC, su aplicación práctica es inviable dado el elevado coste de la prueba.

Al comparar los aislamientos de cepas STEC obtenidas de heces según la estación de muestreo, se observó que no existían diferencias ya que la mitad se obtuvo en primavera y la otra mitad en verano. Tampoco Sánchez et al. (2010a) observaron variaciones

estacionales en el aislamiento de cepas STEC a partir de heces de ovino. Respecto a la incidencia de aislamientos en leche a lo largo del año se obtuvieron un mayor número de aislados en los meses de invierno (datos no mostrados), sin embargo no se puede concluir que exista una mayor incidencia en invierno por las características del muestreo (la toma de muestras de leche de tanque no fue homogénea a lo largo del año, se tomaron diferente número de muestras en las distintas estaciones en función de la disponibilidad). Los brotes y casos de infecciones alimentarias humanas producidos por STEC y que fueron declarados durante el año 2010 en la UE (EFSA, 2012) mostraban una mayor incidencia en verano y otoño probablemente debido a que las condiciones climatológicas favorecen la supervivencia de la bacteria en el medio ambiente. Las diez cepas de EPEC (cuatro de heces, cinco de agua y una de aire) que se aislaron en cinco de las 10 explotaciones muestreadas, se obtuvieron, como en el caso de STEC, la mitad en primavera y la mitad en verano.

La Tabla I.7 proporciona información acerca de las condiciones higiénico-sanitarias de parte de las explotaciones en las que se aislaron cepas STEC a partir de muestras de leche y/o ambientales. Esto se refleja en las notas obtenidas en las auditorías realizadas durante los años 2009 y 2010 para su certificación. Se observa que no existe una relación directa entre la nota de seguridad alimentaria de la explotación y la presencia de STEC, ya que se aislaron estas cepas tanto en rebaños con notas máximas (buenas prácticas ganaderas e higiene en la producción) como en rebaños con seguridad comprometida por causas como elevados recuentos bacteriológicos o presencia de inhibidores en la leche (antibióticos). Esto podría ser debido, por un lado, a que los rumiantes domésticos son reservorio de STEC (Farrokh et al., 2013) pudiendo, por tanto, aparecer en el rebaño sin relación aparente con el manejo y, por otro, a que pueden existir fuentes de contaminación externas a la granja. En relación con la segunda posibilidad, algunos trabajos señalan que han aislado cepas STEC semejantes (PFGE) a las obtenidas de rumiantes domésticos y de varias especies de animales silvestres (Sánchez et al., 2010b; Sánchez et al., 2010c; Díaz et al., 2011; Hofer et al., 2012), que también son reservorios de STEC y que pueden ser origen de estas cepas para las ovejas ya que comparten zonas de pasto y abrevaderos.

En resumen, el sistema de enzimo-inmunoensayo de microplaca en fase sólida (Prospect® Shiga Toxin) no es útil para la detección de Stxs en leche de oveja. La incidencia

de genes *stxs* en las explotaciones pertenecientes al CPO fue muy elevada aunque el aislamiento de cepas STEC fue considerablemente inferior. También es destacable el número de explotaciones en las que se detectaron cepas de EPEC tanto en leche como en muestras ambientales. En cualquier caso, resulta evidente que la leche de oveja y la propia explotación son una fuente significativa de cepas de estos dos tipos de *E. coli* patógenos para el hombre que podrían estar presentes en quesos elaborados con leche cruda y, por tanto, suponer un riesgo para la salud humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acheson, D. W. K., Lincicome, L. L., De Breucker, S. and Keusch, G. T. 1996. Detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and milk by commercial enzyme immunoassay. *J. Food Prot.*, 59: 344-349.
2. Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D., Silveira, W. and Pestana, d. C. A. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.*, 115: 297.
3. Almeida, P. M., Arais, L., Andrade, J., Prado, E. H., Irino, K. and Cerqueira, A. 2012. Characterization of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from dogs. *Vet. Microbiol.*, 158: 420-424.
4. Anónimo. 2012. ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. International Organization for Standardization. Ginebra.
5. Anónimo. 2001. UNE-EN ISO 16654:2001. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección de *Escherichia coli* O157. Asociación Española de Normalización y Certificación. Madrid.

6. Araujo, V., Pagliares, V., Queiroz, M. and Freitas-Almeida, A. 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 1172-1177.
7. Bandyopadhyay, S., Lodh, C., Rahaman, H., Bhattacharya, D., Bera, A., Ahmed, F., Mahanti, A., Samanta, I., Mondal, D. and Sarkar, S. 2012. Characterization of shiga toxin producing (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in raw yak (*Poephagus grunniens*) milk and milk products. *Res. Vet. Sci.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.12.011>.
8. Baylis, C. L. 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol.*, 62: 293-307.
9. Baylis, C. L. 2008. Growth of pure cultures of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in a range of enrichment media. *J. Appl. Microbiol.*, 105: 1259-1265.
10. 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. *Adv. Food Nutr. Res.*, 60: 67-117.
11. Beutin, L., Montenegro, M. A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S. and 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.

12. Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Dahbi, G. and González, E. A. 2003. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1351-1356.

13. Caro, I., Mateo, J., Rúa, J. and García-Armesto, M. R. 2011. Occurrence of *Escherichia coli* O157, O111 and O26 in raw ewe's milk and performance of two enrichment broths and two plating media used for its assessment. *Int. J. Food Microbiol.*, 146: 84-87.

14. Caro, I., Fernández-Barata, V. M., Alonso-Llamazares, A. and García-Armesto, M. R. 2006. Detection, occurrence, and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from raw ewe's milk in Spain. *J. Food Prot.*, 69: 920-924.

15. Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J., Dhabi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A. and Sanchez, 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.

16. D'Amico, D. J., Groves, E. and Donnelly, C. W. 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J. Food Prot.*, 71: 1580-1589.

17. Díaz, S., Vidal, D., Herrera-León, S. and Sánchez, S. 2011. Sorbitol-fermenting, β -glucuronidase-positive, Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157: H7 in free-ranging red deer in south-central Spain. *Foodborne Pathog. Dis.*, 8: 1313-1315.

18. Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., Salamoura, A., Kansouzidou, A. and Levidiotou, S. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from foods in Greece. *Int. J. Food Microbiol.*, 82: 273-279.
19. EFSA. 2012. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3): 161-189.
20. Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K. and Govaris, A. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.*, 162 (2): 190-212.
21. Feng, P. C., Jinneman, K., Scheutz, F. and Monday, S. R. 2011. Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 6699-6702.
22. Gavin, P. J., Peterson, L. R., Pasquariello, A. C., Blackburn, J., Hamming, M. G., Kuo, K. J. and Thomson, R. B. 2004. Evaluation of performance and potential clinical impact of ProSpecT Shiga toxin *Escherichia coli* microplate assay for detection of Shiga toxin-producing *E. coli* in stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 1652-1656.
23. Hernandez, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A. M. and Gomes, T. A. T. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 297: 137-149.

24. Hofer, E., Cernela, N. and Stephan, R. 2012. Shiga toxin subtypes associated with Shiga toxin–producing *Escherichia coli* strains isolated from red deer, roe deer, chamois, and ibex. *Foodborne Pathog. Dis.*, 9: 792-795.
25. Holko, I., Bisova, T., Holkova, Z. and 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.
26. Kaspar, C., Doyle, M. E. and Archer, J. 2009. White paper on non-O157:H7 Shiga-toxin producing *E.coli* from meat and non-meat sources. Disponible en: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_NonO157STEC_4_10.pdf. Fri food safety reviews.
27. LeJeune, J. T., Besser, T. E. and Hancock, D. D. 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3053-3057.
28. 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.
29. Meng, J., Jeffrey, T. L., Zhao, T. and Doyle, M. P. 2013. Enterohemorrhagic *Eshcerichia coli*. In: Doyle, M. P. and Buchanan, R. L. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA, pp. 287-309.

30. Meng, J., Doyle, M. P., Zhao, T. and Zhao, S. 2007. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Doyle, M. P. and Beuchat, L. R. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA, pp. 249-269.
31. Muehlherr, J. E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J. E. and Stephan, R. 2003. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. J. Dairy Sci., 86: 3849-3856.
32. Otero, V. 2013. Resultados de los programas de vigilancia analítica de la leche de tanque de los rebaños del consorcio: patógenos específicos en leche de tanque: *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC). In: Gonzalo, C. (Ed.), Programas de calidad, seguridad y certificación de la leche del consorcio de promoción del ovino. Consorcio de Promoción del Ovino (CPO), Villalpando (Zamora), pp. 71-76.
33. Paton, J. C. & Paton, A. W. 1998a. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev., 11: 450-479.
34. Paton, A. W. & Paton, J. C. 1998b. 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.
35. Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J. E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R. and Alonso, J. M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. Int. J. Food Microbiol., 107: 212-217.

36. Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Benítez, J. M., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Dahbi, G., López, C. and Mora, A. 2010a. Variation in the prevalence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in four sheep flocks during a 12-month longitudinal study. *Small Ruminant Res.*, 93: 144-148.
37. Sánchez, S., Martínez, R., Rey, J., Garcia, A., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Herrera-Leon, S. and Echeita, A. 2010b. Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157: H7 isolates from domestic and wild ruminants. *Vet. Microbiol.*, 142: 445-449.
38. Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Vidal, D., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Herrera-León, S. and Echeita, A. 2010c. Detection and characterisation of O157: H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Vet. Microbiol.*, 143: 420-423.
39. Silva, Z. N., Cunha, A. S., Lins, M. C., Carneiro, L. A. M., Almeida, A. C. F. and Queiroz, M. L. P. 2001. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Rev. Saúde Pública*, 35: 375-379.
40. Solomakos, N., Govaris, A., Angelidis, A. S., Pournaras, S., Burriel, A. R., Kritas, S. K. and 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.

41. Vimont, A., Delignette-Muller, M. and Vernozy-Rozand, C. 2007. Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food: a controversial use. *Lett. Appl. Microbiol.*, 44: 326-331.

42. Vimont, A., Vernozy-Rozand, C. and 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.

43. Willford, J., Mills, K. and Goodridge, L. D. 2009. Evaluation of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of Shiga toxin. *J. Food Prot.*, 72: 741-747.



CAPÍTULO II: Caracterización y estudio comparativo de cepas de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC) aisladas de leche de oveja, de sus explotaciones y de pacientes

INTRODUCCIÓN

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) se identificaron como agentes de enfermedades de transmisión alimentaria en el año 1982, cuando 47 individuos enfermaron debido al consumo de hamburguesas servidas en un establecimiento de comida rápida en los Estados Unidos de América (USA). No obstante, un estudio retrospectivo demostró que más de 3.000 cepas aisladas previamente eran similares a éstas y a la obtenida de una paciente con colitis hemorrágica en 1975. La mayoría pertenecían al serotipo O157:H7 (Meng et al., 2013).

Las personas afectadas por cepas STEC pueden sufrir diarrea que, a su vez puede devenir en colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH), otros procesos graves e, incluso, la muerte. Estas cepas pueden pertenecer a diferentes serogrupos y serotipos y sus fenotipos suelen diferir de los característicos de la cepa tipo de *E. coli*. Los serogrupos más patógenos, además del O157, en USA, parecen ser: O26, O111, O103, O121 y O145. En la Unión Europea (UE), los serogrupos más preocupantes son los anteriores y también el O91 aunque un número mucho mayor de serogrupos y serotipos pueden producir Stxs. Por este motivo se ha propuesto clasificar las cepas STEC en cinco “seropatotipos”, dependiendo de su incidencia en procesos clínicos, la gravedad de los mismos y su participación en brotes (Farrokh et al., 2013). Mención especial merece la cepa del serotipo O104:H4 responsable del brote asociado a semillas germinadas contaminadas que afectó, en Alemania y Francia, a 3.126 individuos, otros 773 desarrollaron SUH y 46 fallecieron. Esta cepa posee factores de virulencia de *E. coli* enteroagregativo y también el gen *stx2a* de STEC (EFSA, 2011).

Todas las cepas STEC, tanto las O157 como las no-O157, poseen los genes *stxs* que codifican para las toxinas Shiga (Stxs). Entre las Stxs hay dos tipos; las Stxs1 y las Stxs2 que, a su vez, muestran diferentes subtipos (Beutin et al., 2007). Las cepas clínicas suelen poseer el gen *stx2* con mayor frecuencia que el *sxt1*, habiéndose asociado los subtipos *stx2a*, *stx2b* y *stx2d* con CH y SUH (Bergan et al., 2012). Además de la producción de Stxs, las cepas STEC pueden poseer otros determinantes de

virulencia que han sido exhaustivamente tratados en el apartado “Introducción general”.

El reservorio natural de STEC son los rumiantes portadores que eliminan la bacteria en sus heces. Estas ensucian las ubres y la piel y contaminan, además, el ambiente de la explotación, donde pueden permanecer durante bastante tiempo. La excreción parece ser un fenómeno esporádico, pero existen datos que demuestran que hay animales portadores durante meses. También se ha observado que la incidencia es mayor en verano. Como los animales no presentan síntomas clínicos ni lesiones, sus canales son declaradas aptas para el consumo humano tras la inspección *ante y post-mortem* y lo mismo ocurre con su leche. El contacto directo, tanto con personas y animales infectados como el uso de aguas de recreo, y también el agua de bebida contribuyen a la infección, aunque son los alimentos y el agua contaminados los más frecuentemente implicados (Farrokh et al., 2013).

La presencia de cepas STEC en la leche es debida, principalmente, a contaminación de origen fecal, aunque se ha sugerido la posibilidad de que cepas STEC sean agentes de mamitis subclínicas. En cualquier caso, es importante intentar saber cómo las cepas STEC se distribuyen en la explotación, cómo los animales las adquieren y cómo se contamina la leche así como la posible relación entre las cepas de origen animal y las cepas clínicas. La información sobre estos aspectos es muy escasa; tanto, que varios países que han intentado llevar a cabo una evaluación cuantitativa del riesgo asociado a la presencia de STEC en leche cruda y productos lácteos elaborados con leche cruda no han podido realizarla por “la incertidumbre” debida, principalmente, a la falta de datos (Farrokh et al., 2013).

Otro aspecto interesante es la resistencia a los antimicrobianos de las cepas STEC. Inicialmente, eran sensibles a la mayoría de los compuestos utilizados frente a bacterias Gram-negativas pero posteriormente, se ha apreciado un incremento de la resistencia tanto entre las cepas de STEC O157 como en las no-O157. Se ha sugerido que las cepas de origen humano y las obtenidas de animales de abasto han adquirido resistencia y multi-resistencia debido al empleo de ciertos antimicrobianos en clínica humana y sanidad animal (Meng et al., 2013).

OBJETIVO

El trabajo presentado en este Capítulo tenía varios objetivos. El primero, conocer el genotipo de cepas STEC aisladas de leche de oveja, de muestras obtenidas en explotaciones positivas –heces, agua, pienso y aire- y de coprocultivos de pacientes, prestando especial atención a los genes que codifican para factores de virulencia. En segundo lugar, comparar todas las cepas estudiadas para así poder establecer la relación existente entre ellas y el posible origen de las mismas. Finalmente, investigar los patrones de resistencia a los antimicrobianos en la población estudiada.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE CEPAS STEC DE PACIENTES DEL HOSPITAL DE LEÓN

Entre los meses de Marzo y Mayo del año 2011, se recibieron cultivos procedentes del Hospital de León. Se trataba de muestras de heces de pacientes que nos llegaron de la forma siguiente:

- Placas de Sorbitol MacConkey Agar suplementado con Cefixima y Telurito (CT-SMAC, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) con cepas aisladas (cultivo puro).
- Placas de Columbia Agar con 5% de sangre de oveja (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) con siembra directa de heces (cultivo mixto).
- Placas de CT-SMAC (BioMérieux) con siembra directa de heces (cultivo mixto).

En el primer caso, la cepa se sembró en Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid, Basingstoke, UK), incubando las placas a 37°C durante 24 horas. Se tomó una cantidad suficiente de colonias que se guardó en Nutrient Broth (NB, Oxoid) con un 40% de Glicerol (Acofarma, Barcelona, España) a -40 °C para su posterior caracterización, incluida la detección de los genes *stxs*.

De las placas de Columbia Agar (Becton Dickinson) y CT-SMAC (BioMérieux) conteniendo la siembra directa de las heces, se tomó una muestra representativa del crecimiento, realizando un enriquecimiento en NB (Oxoid) con 0,6% de Yeast Extract (YE, Oxoid) que se incubó a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a investigar la presencia de los genes *stxs*. Los caldos de enriquecimiento positivos para alguno de estos genes, se sembraron en el medio CT-SMAC (Oxoid). Finalmente, se investigó la presencia de los genes *stxs* en las colonias sospechosas obtenidas de los enriquecimientos positivos. Las cepas que poseían alguno de ellos, se guardaron como en el caso anterior en NB (Oxoid) con glicerol (Acofarma) para su caracterización posterior.

Además, nos proporcionaron 14 cepas O157:H7 aisladas de pacientes del Hospital de León entre los años 2009 y 2011. Estas últimas procedían del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid).

2. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS STEC

En total, se estudió una población de 80 cepas. De ellas, 50 procedían de muestras de leche de tanque, 12 fueron obtenidas de los muestreos en explotaciones y 18 de pacientes del Hospital de León.

Las cepas obtenidas de leche se analizaron con la galería Api® 20E (BioMérieux) diseñada para la identificación de especies de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y de otros géneros de bacilos Gram negativos (<http://apiweb.biomerieux.com>).

Los aislados de *E. coli* STEC se sometieron a dos pruebas de aglutinación con partículas de látex:

- Dryspot *E. coli* O157 test (Oxoid), que es una prueba para la identificación de *E. coli* O157.
- Dryspot *E. coli* Seroscreen (Oxoid), que es una prueba para la detección de seis serogrupos de *E. coli* no-O157: O26, O91, O103, O111, O128 y O145.

En ambos casos, se utilizan partículas azules de látex sensibilizadas con anticuerpos específicos de conejo reactivos frente al antígeno somático correspondiente, y desecadas sobre la superficie de tarjetas. Las partículas de látex aglutinan en presencia de los antígenos específicos y forman grumos visibles.

Para la realización de ambas pruebas se siguió el mismo procedimiento, partiendo de colonias obtenidas de placas de Sorbitol MacConkey Agar (SMAC, Oxoid) previamente incubadas a 37°C durante 24 horas.

- Se añadió una gota de tampón (Phosphate buffered saline -PBS-) (facilitado por el fabricante) en el área de prueba de la tarjeta con cuidado de que el líquido no se mezclara con los reactivos de látex desecados.
- Se tomó una colonia sospechosa con una de las espátulas suministradas con el “kit” y se aplicó sobre el área de control mezclándola con el PBS hasta la obtención de una suspensión ligeramente turbia y uniforme.

- Se extendió con la espátula la suspensión por el área de reacción hacia las manchas de látex desecado, hasta su completa disolución cubriendo toda el área de reacción.
- En los casos en los que se produjo aglutinación, se procedió del mismo modo utilizando esta vez el látex control. Este paso se realizó para comprobar que las colonias no eran autoaglutinantes.
- Se consideró un resultado positivo cuando se produjo una aglutinación de las partículas de látex en un lapso de tiempo no superior a 60 segundos.

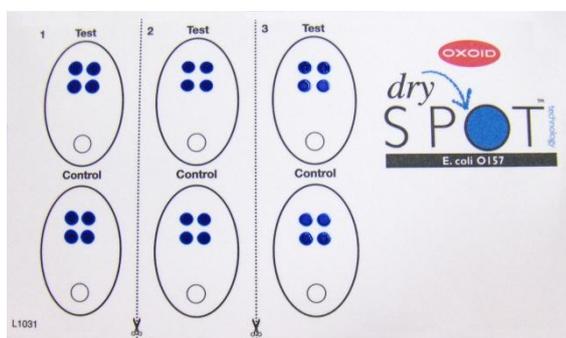


Figura II.1. Imagen de las tarjetas utilizadas para la realización de la prueba Dryspot *E. coli* O157 test.

A continuación se describen las pruebas realizadas a las cepas STEC O157 y a las no-O157.

2.1. Cepas STEC O157

2.1.1. Confirmación y caracterización inicial

Se procedió a una nueva serotipificación utilizando métodos convencionales. Así, las cepas sospechosas de ser O157:H7; es decir, aquellas que resultaron positivas o dudosas en el “Dryspot *E. coli* O157 test” se confirmaron utilizando un antisero comercial obtenido del Stanten Serum Institut (SSI Diagnostica, Copenhague, Dinamarca). Para ello, se tomó una pequeña cantidad de crecimiento de la cepa en TSA (Becton Dickinson) que se mezcló con el suero, examinando la posible aglutinación. En los casos en los que la cepa aglutinó, se comprobó que no era autoaglutinante aplicando la misma técnica, pero en este caso, con solución salina.

La capacidad para fermentar la lactosa y el sorbitol, la actividad β -glucuronidasa y la actividad hemolítica de los aislados O157:H7 fue ensayada en los medios MacConkey Agar (Becton Dickinson), SMAC (Becton Dickinson), Chromocult Coliform Agar (Becton Dickinson) y Enterohaemolysin Agar (Oxoid). Para ello, las cepas se sembraron en los medios citados, incubando a 37°C durante 24 horas. Las características esperables en cada uno de los medios eran:

- MacConkey Agar (Becton Dickinson): las colonias con capacidad para fermentar la lactosa presentaban una coloración rosa, mientras que las que no la poseían eran incoloras.
- SMAC (Becton Dickinson): las colonias con capacidad para fermentar el sorbitol presentaban una coloración rosa, mientras que las que no la poseían eran incoloras.
- Chromocult Coliform Agar (Becton Dickinson): las colonias con actividad β -glucuronidasa positivas presentaban una coloración rosa, mientras que las que no la poseían mostraban una coloración azulada.
- Enterohaemolysin Agar (Oxoid): las colonias productoras de α -hemolisina producían hemólisis a las 4 horas de incubación y tras 24 horas, la zona de hemólisis era bastante amplia. En el caso de producir enterohemolisina, las colonias la mostraban únicamente a partir de las 24 horas de incubación, siendo la zona de hemólisis mucho menor que en el caso de la α -hemolisina.

2.1.2. Detección de genes mediante PCR

Posteriormente, se investigaron, mediante PCR, los genes siguientes (Tabla II.1).

- Genes que codifican para las toxinas Shiga: *stx1* (Pollard et al., 1990) y *stx2* (Olsen et al., 1995) y los subtipos de estos genes (Scheutz et al., 2012).
- Genes que codifican para los antígenos O157 (somático *O157rfbE*) (Desmarchelier et al., 1998), y H7 (flagelar *fliCh7*) (Gannon et al., 1997).
- Gen que codifica para la intimina (*eae* y su variante *eaey1*) (Gannon et al., 1993; Oswald et al., 2000).

- Gen que codifica para la enterohemolisina (*ehxA*) (Wang et al., 2002).
- Plásmido pO157 (*pCVD419*) (Fratamico et al., 1995).

Tabla II.1. Genes y cebadores utilizados en las pruebas de PCR para la caracterización de las cepas STEC O157:H7.

Gen Diana	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb) ^a	Referencia
<i>stx1</i>	VT1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	(Pollard et al., 1990)
	VT1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
<i>stx2</i>	SLTII1	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	448	(Olsen et al., 1995)
	SLTII2	GGATGCATCTCTGGTCATTG		
<i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881	(Oswald et al., 2000)
	SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG		
<i>EHEC hlyA</i>	HlyA-a	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG	569	(Wang et al., 2002)
	HlyA-b	TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC		
<i>O157rfbE</i>	O157AF	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG	497	(Desmarchelier et al., 1998)
	O157AR	CATTGGCATCGTGTGGACAG		
<i>fliCh7</i>	FLICH7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625	(Gannon et al., 1997)
	FLICH7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC		
<i>eae-y1</i>	AE 19	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA	1.087	(Gannon et al., 1993)
	AE 20	TCAGCGTGGTTGGATCAACCT		
<i>pCVD419</i>	MFS1F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	166	(Fratamico et al., 1995)
	MFS1R	CTTCACGTCACCATACATAT		
<i>stx1a</i>	stx1a-F1	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478	
	stx1a-R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG		
<i>stx1c</i>	stx1c-F1	CCTTTCTGGTACAACAGCGGTT	252	
	stx1c-R1	CAAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGA		
<i>stx1d</i>	stx1d-F1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203	
	stx1d-R1	CTCTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA		
<i>stx2a</i>	stx2a-F2	GCGATACTG(A/G)G(C/G)ACTGTGGCC	349	
	stx2a-R3	CCG(G/T)CAACCTTCACTGTAATGTG	347	
	stx2a-R2	GGCCACCTTCACTGTGAATGTG		
<i>stx2b</i>	stx2b-F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	251	
	stx2b-R1	CAGCAAATCCTGAACCTGACG		
<i>stx2c</i>	stx2c-F1	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	177	(Scheutz et al., 2012)
	stx2c-R2	CCGGCCAC(C/T)TTTACTGTGAATGTA		
<i>stx2d</i>	stx2d-F1	AAA(A/G)TCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	179	
	stx2d-R1	TT(C/T)CCGGCCACTTTTACTGTG	280	
	stx2d-R2	GCCTGATGCACAGGTAAGTGGAC		
<i>stx2e</i>	stx2e-F1	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	411	
	stx2e-R2	CTTCCTGACACCTTACAGTAAAGGT		
<i>stx2f</i>	stx2f-F1	TGGGCGTCATTCAGTGGTTG	424	
	stx2f-R1	TAATGGCCGCCTGTCTCC		
<i>stx2g</i>	stx2g-F1	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573	
	stx2g-R1	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT		

^apb: Pares de bases

Las condiciones de la PCR fueron diferentes en función de los genes que se buscaban. En el caso de los genes que codifican para las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*), la Intimina (*eae*) y la Enterohemolisina (*ehxA*) se realizó una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 25 ciclos, cada uno de ellos compuesto por tres pasos, un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un segundo de hibridación a 56°C durante 40 segundos y una elongación a 72°C durante 1 minuto. Finalmente, se realizó un último paso de elongación final a 72°C durante 7 minutos.

Las condiciones de la PCR para los subtipos de los genes de las toxinas Shiga fueron: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 25 ciclos compuestos por tres pasos, un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 50 segundos, una hibridación a 64°C durante 40 segundos y una elongación a 72°C durante 40 segundos. Tras los ciclos se realizó una elongación final a 72°C durante 7 minutos.

En el caso de los genes que codifican para los antígenos O157 (somático *O157rfbE*) y H7 (flagelar *fliCh7*), la variante de la intimina γ 1 (*eae γ 1*) y el plásmido pO157 las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización previa a 94°C durante 5 minutos seguida de 25 ciclos compuestos por tres pasos, un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 50°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Tras los 25 ciclos, un último paso de elongación a 72°C durante 7 minutos.

La amplificación de estos genes se realizó en un equipo Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Life Technologies S.A., Applied Biosystems división, Madrid, España).

El producto de la PCR fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa (Pronadisa, Chemie Brunschwig, Basel, Suiza) al 1,5% en Tris-Acetic Acid-EDTA (TAE, Laboratorios Conda, Madrid, España) y para su revelado se utilizó una solución (10 mg/ml) de bromuro de etidio (AppliChem, Darmstadt, Alemania). Los resultados se observaron exponiendo el gel en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a la luz ultravioleta y se realizó la captura de la imagen mediante el equipo Molecular Imager GelDoc XR System (Bio-Rad Laboratories). La concentración del gel

de agarosa en el caso de los genes que codifican las toxinas Shiga y los subtipos de estas toxinas fue del 1,8% para facilitar la separación de los productos de PCR.

2.1.3. Fagotipado

El fagotipado de las cepas se realizó mediante el método descrito por Khakhria et al. (1990). Se llevó a cabo en el Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España) utilizando los fagos facilitados por el “National Microbiology Laboratory” (Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Canada). Un total de 90 fagotipos pueden ser identificados mediante el uso de 16 bacteriófagos diferentes.

Se partió de un cultivo fresco en TSA (Becton Dickinson) tanto de las cepas a fagotipar como de los controles. Se transfirió una pequeña cantidad del crecimiento a caldo común (Becton Dickinson) con NaCl al 0,85% y se incubó a 37°C con agitación entre una y dos horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se sembraron las placas de agar común (Becton Dickinson) con NaCl al 0,85%, inundando las placas con el caldo, y dejando secar unos minutos. Una vez secas las placas, se depositó una gota de cada suspensión de los 16 bacteriófagos, utilizando unas plantillas y se dejó secar a temperatura ambiente hasta que las gotas se absorbieron. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas y se leyeron las placas de lisis. Se compararon los resultados con un esquema establecido en el que la combinación de las lisis producidas por los 16 fagos se corresponde con un fagotipo determinado.

2.1.4. Resistencia a antimicrobianos

El antibiograma de las cepas se llevó a cabo mediante un método de difusión en agar de acuerdo con los criterios del EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (EUCAST, 2012a). Se utilizaron un total de 13 discos (Oxoid) en el antibiograma y nueve más en el antibiograma ampliado.

Tabla II.2. Antimicrobianos utilizados y sus concentraciones en los discos. Los nueve últimos antibióticos fueron los utilizados en el antibiograma ampliado.

Antimicrobiano		Concentración
AMP	Ampicilina	10 µg
S	Estreptomina	10 µg
KF	Cefalotina	30 µg
NA	Ácido Nalidíxico	30 µg
CTX	Cefotaxima	30 µg
TE	Tetraciclina	30 µg
AMC	Amoxicilina – Ácido Clavulánico	30 µg
SXT	Trimetoprim - Sulfametoxazol	25 µg
CN	Gentamicina	10 µg
CIP	Ciprofloxacina	5 µg
K	Kanamicina	30 µg
C	Cloranfenicol	30 µg
S3	“Compound sulphonamides”	300 µg
FOX	Cefoxitina	30 µg
FEP	Cefepima	30 µg
CEC	Cefaclor	30 µg
TIC	Ticarcilina	75 µg
CAZ	Ceftazidima	30 µg
ATM	Aztreonam	30 µg
PRL	Piperaciclina	30 µg
CXM	Cefuroxima	30 µg
IPM	Imipenem	10 µg

Se utilizaron placas de Mueller Hinton Agar (Becton Dickinson). Se partió de una placa de TSA (Becton Dickinson) con cultivo puro y a continuación se realizaron los pasos siguientes:

- Preparación del inóculo: Se dispersaron varias colonias en solución salina hasta lograr una suspensión uniforme de una turbidez comparable al valor 0,5 de la escala de McFarland.
- Inoculación de las placas: La suspensión se utilizó antes de transcurrir 15 minutos una vez preparada. Se introdujo una torunda de algodón en la suspensión, eliminando el exceso de líquido presionando la torunda contra las paredes del tubo. Se distribuyó el inóculo uniformemente sobre la superficie de la placa sembrando en tres direcciones.

Capítulo II. Material y métodos

- Almacenamiento de los discos de antimicrobianos: Los discos se almacenaron a 4-8°C en recipientes cerrados con un desecador y protegidos de la luz. Antes de abrir los envases, se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente para evitar condensación de agua.
- Aplicación de los discos: Se colocaron en un plazo inferior a 15 minutos tras la inoculación de las placas, procurando que contactaran bien con la superficie del medio y una distribución adecuada de forma que los halos de inhibición, de las cepas sensibles, no se superpusieran.
- Incubación: En los 15 minutos siguientes a la aplicación de los discos durante un período de 16-20 horas a $35\pm 1^\circ\text{C}$.

El método utilizado cumplía la “Regla” de los 15-15-15 minutos (EUCAST, 2012a) que consiste en lo siguiente:

- Usar el inóculo dentro de los 15 minutos después de su preparación y nunca más allá de los 60 minutos.
- Colocar los discos dentro de los 15 minutos después de inoculadas las placas.
- Iniciar la incubación dentro de los 15 minutos después de la aplicación de los discos.

Tras la incubación, se midieron los halos de inhibición utilizando un calibre y también una hoja de cálculo para discriminar entre cepas sensibles (S), intermedias (I) y resistentes (R) en función de los diámetros que se presentan en la Tabla II.3.

Tabla II.3. Diámetros de las zonas de inhibición utilizados para clasificar las cepas STEC como resistentes (R), intermedias (I) o sensibles (S) a un antibiótico.

Agente Antimicrobiano	Diámetro zona inhibición (mm)			Referencia
	R	I	S	
Ampicilina	< 14		≥ 14	(EUCAST, 2012b)
Cefotaxima	< 17		≥ 20	
Amoxicilina – Ácido Clavulánico	< 17		≥ 17	
Trimetoprim - Sulfametoxazol	< 13		≥ 16	
Gentamicina	< 14		≥ 17	
Ciprofloxacina	< 19		≥ 22	
Cloranfenicol	< 17		≥ 17	
Cefepima	< 21		≥ 24	
Ticarcilina	< 23		≥ 23	
Ceftazidima	< 19		≥ 22	
Aztreonam	< 24		≥ 27	
Piperaciclina	< 15		≥ 18	
Cefuroxima	< 18		≥ 18	
Imipenem	< 16		≥ 22	
Estreptomina	≤ 11	12-14	≥ 15	(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005)
Cefalotina	≤ 14	15-17	≥ 18	
Ácido Nalidíxico	≤ 13	14-18	≥ 19	
Tetraciclina	≤ 14	15-18	≥ 19	
Kanamicina	≤ 12	13-14	≥ 15	
“Compound sulphonamides”	≤ 12	13-16	≥ 17	
Cefoxitina	≤ 14	15-17	≥ 18	
Cefaclor	≤ 14	15-17	≥ 18	

En las cepas resistentes a uno o más antibióticos se investigó el determinante que confería la resistencia. Se realizaron pruebas de PCR para detectar los genes implicados en la resistencia a los diferentes antibióticos además de un integrón de clase I (Tabla II.4).

Tabla II.4. Cebadores utilizados en la detección de resistencia a antimicrobianos.

Diana	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb) ^a	Referencia	Condiciones PCR ^b
Integrón clase I	5CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC	variable	(Guerra et al., 2004)	A
	3CS	AAGCAGACTTGACCTGAT			
<i>catA1</i>	catF	CCACCGTTGATATATCCC	623	(Guerra et al., 2001)	A
	catB	CCTGCCACTCATCGCAGT			
<i>tetA</i>	tetA-F	GCTACATCCTGCTTGCCCT	210	(Guerra et al., 2004)	A
	tetA-B	CATAGATCGCCGTGAAGA			
<i>tetB</i>	tetB-F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTGG	600	(Ng et al., 1999)	A
	tetB-B	GTAATGGGCCAATAACACCG			
<i>tetD</i>	tetD-F	AAACCATTACGGCATTCTGC	787	(Ng et al., 2001)	A
	tetD-R	GACCGGATACACCATCCATC			
<i>floR</i>	FloF	CACGTTGAGCCTCTATAT	868	(Guerra et al., 2001)	A
	FloB	ATGCAGAAGTAGAACGCG			
<i>strA</i>	strA-F	CCTGGTGATAACGGCAATTC	548	(Guerra et al., 2004)	A
	strA-B	CCAATCGCAGATAGAAGG			
<i>strB</i>	strB-F	ATCGTCAAGGGATTGAAACC	509	(Madsen et al., 2000)	A
	strB-B	GGATCGTAGAACATATTGGC			
<i>cmlA1-like</i>	cmlA-F	TGTCATTTACGGCATACTCG	435	(Guerra et al., 2001)	A
	cmlA-B	ATCAGGCATCCCATTCCCAT			
<i>Cat2</i>	Cat2-F	CCGGATTGACCTGAATACCT	567	(Randall et al., 2004)	A
	Cat2-R	TCACATACTGCATGATGAAC			
<i>Cat3</i>	C-3	CCATACTCATCCGATATTGA	275	(Yoo et al., 2003)	A
	C-R	CCATCACATACTGCATGATG			
<i>Cat4</i>	C-4	CCGGTAAAGCGAAATTGTAT	451	(Yoo et al., 2003)	A
	C-R	CCATCACATACTGCATGATG			
<i>sul2</i>	sulII-F	TCAACATAACCTCGGACAGT	707	(Chu et al., 2001)	A
	sulII-B	GATGAAGTCAGCTCCACCT			
<i>CMY2</i>	CMY2-F	CTGCGCTCTGCTGCTGACAGC	1093	(González-Sanz et al., 2009)	B
	CMY2-R	CTCGACACGGACAGGGTTAGG			
<i>DHA</i>	DHA-F	CTGATGAAAAAATCGTTATC	1141	(Yan et al., 2002)	B
	DHA-R	ATTCCAGTGCACCTAAAATA			
<i>SHV</i>	SHV-F	CCCTGTTAGCCACCCTGCCG	829	(González-Sanz et al., 2009)	B
	SHV-R	CGTTGCCAGTGCTCGATCAGC			
<i>pse1</i>	pse1-F	CGCTTCCCCTTAAACAAGTAC	419	(Sandvang et al., 1998)	B
	pse1-B	CTGGTTCATTTAGATAGCG			
<i>OXA1</i>	OXA1-F	ATGAAAACACAATACATATCAACTTCG	820	(González-Sanz et al., 2009)	B
	OXA1-R	GTGTGTTTAGAATGGGTGATCGCATT			
<i>CTX-M</i>	ctxM-F	ATGTGCAG(C/T)ACCAGTAA(A/G)GT	593	(Pagani et al., 2003)	B
	ctxM-R	TGGGT(A/G)AA(A/G)TA(A/G)GT(G/C)ACCAGA			
<i>TEM</i>	TEM-F	GTATTCAACATTTCCGTGTGCG	854	(González-Sanz et al., 2009)	B
	TEM-R	CCAATGCTTAATCAGTGAGGC			
<i>gyrA</i>	GYRA-P1	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC	347	(Griggs et al., 1996)	C
	GYRA-P2	TACCGTCATA(G/C)GTTATCCACG			

^apb: Pares de bases

^bCondiciones de PCR de acuerdo a la Figura II.2.

La amplificación de estos genes se realizó utilizando el equipo Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Life Technologies). Las condiciones de la PCR se

presentan en la Figura II.2. El revelado del producto de PCR se realizó tal y como se ha descrito anteriormente.

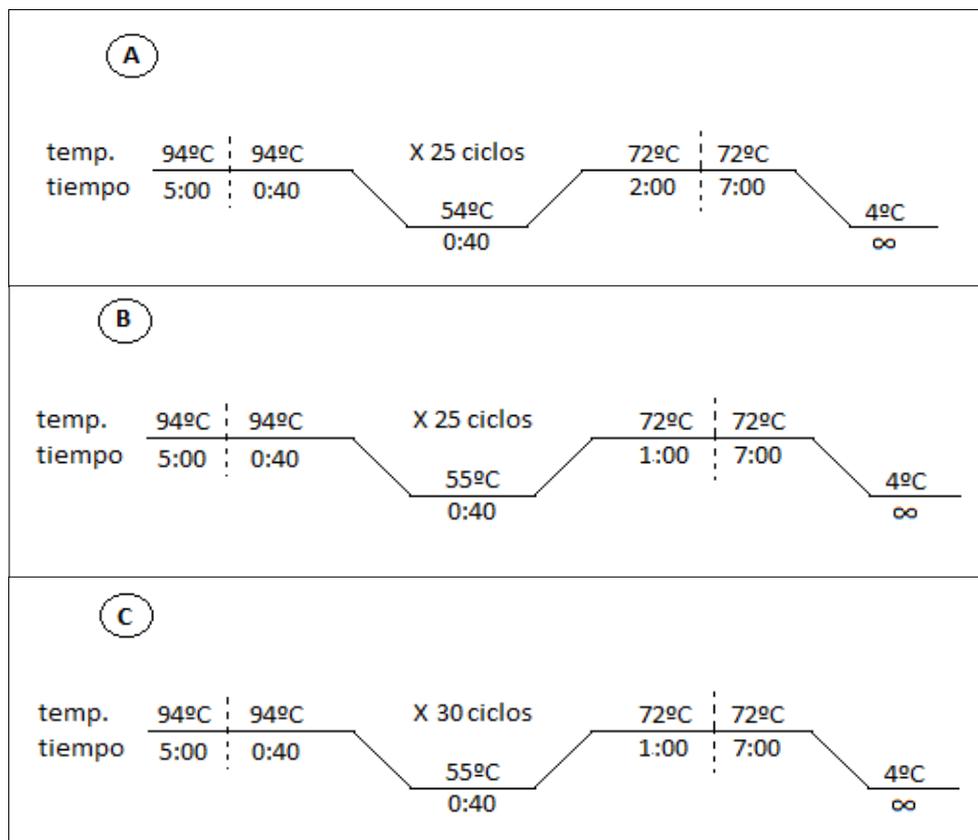


Figura II.2. Condiciones del método PCR utilizadas en la detección de genes de resistencia a antibióticos.

Además, los productos obtenidos en la PCR del Integrón de clase I y de los genes *TEM* y *gyrA* fueron purificados y posteriormente secuenciados. Se utilizó el “kit” de purificación Invisorb® Fragment ClearUp (I. enzimanvitek, STRATEC Molecular GmbH, Berlín, Alemania). El protocolo de purificación consistió en lo siguiente:

- Se añadió al producto de la PCR, 400 µl de “Binding Enhancer” (facilitado por el fabricante). Esta mezcla se añadió a la columna, facilitada por el fabricante, colocada previamente en un tubo de 2 ml también facilitado por el fabricante.
- Se centrifugó a 12.000 rpm durante un minuto y posteriormente se descartó el filtrado.
- Se añadieron 700 µl de “Wash Buffer” (facilitado por el fabricante) y se centrifugó a 12.000 rpm durante un minuto descartando el filtrado y volviendo a centrifugar en vacío en las mismas condiciones.

- Se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se le añadieron 30 μ l de “Elution Buffer” (facilitado por el fabricante) y se mantuvo a temperatura ambiente durante un minuto.
- Finalmente, se centrifugó a 12.000 rpm durante un minuto quedando en el tubo eppendorf el producto purificado.

Los purificados se secuenciaron en un equipo 3730XL (Life Technologies) y las secuencias obtenidas se analizaron utilizando los programas del software Lasergene Core Suite versión 7.0.0 (DNASTar, Inc. Madison, WI, USA). El programa BLAST del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se utilizó para la comparación (alineamiento) de las secuencias en una base de datos de nucleótidos.

El protocolo descrito por Yan et al. (2002) se empleó para la detección de la enzima beta-lactamasa AmpC cromosómica inducible. La técnica consiste en realizar un antibiograma (ya descrito), colocando un agente inductor en el centro de la placa de Mueller Hinton Agar (Becton Dickinson). En este caso el agente inductor utilizado fue Cefoxitina. A continuación, se colocaron los cuatro discos de cefalosporinas separados 25 mm del centro como se muestra en la Figura II.3. Las cefalosporinas utilizadas fueron: Ceftacidima, Cefotaxima, Aztreonam y Cefepima.

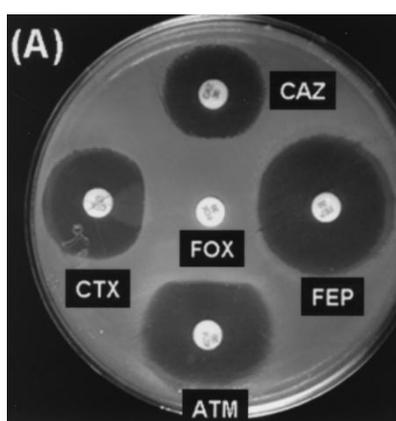


Figura II.3. Colocación de los discos utilizados para el “double-disk antagonism test” (Yan et al., 2002).

2.1.5. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

La técnica PFGE se realizó de acuerdo con el método descrito por PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org>). Básicamente, el protocolo consiste en lo siguiente:

- Siembra de las cepas en placas de TSA (Becton Dickinson) e incubación a 37°C durante 18-24 horas.
- Preparación de las suspensiones celulares. Para ello, se añadieron 2 ml de Cell Suspension Buffer (CSB) (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8) a cada tubo (tubo extra para ajustar la concentración). Se suspendió en el CSB la suficiente cantidad del crecimiento bacteriano en TSA (Becton Dickinson), se homogeneizó y se midió la absorbancia a 420 nm, ajustando a 0,6 en 400 µl de CSB. A cada uno de estos tubos se añadieron 20 µl de Proteínasa K (Fermentas, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) a una concentración de 20 mg/ml, obteniendo una concentración final de 0,5 mg/ml.
- Preparación de los bloques de agarosa. Se utilizó “Seakem Gold agarose for PFGE” (Lonza, Rockland, ME, USA) al 1% en TE Buffer (10 Mm Tris: 1 mM EDTA, pH 8). Se atemperó a 55°C y a continuación se añadió SDS (dodecilsulfato sódico, Panreac Química, S.L.U, Barcelona, España), obteniendo una concentración final del 1%. Se mezclaron 400 µl de agarosa con el mismo volumen de suspensión bacteriana y se dispensaron en los moldes. Se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 15 minutos y a continuación cinco minutos más a refrigeración.
- Lisis bacteriana en los bloques de agarosa. Los bloques solidificados se sumergieron en 5 ml de Cell Lysis Buffer (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8 + 1% Sarcosyl) con 25 µl de Proteínasa K (Fermentas) a una concentración de 20 mg/ml obteniendo una concentración final de 0,1 mg/ml. Se incubaron los “plugs” sumergidos en el Cell Lysis Buffer a 55°C con agitación (150-175 rpm) durante dos horas.

- Lavado de los bloques de agarosa. En primer lugar, se realizaron dos lavados con 10 ml de agua estéril y tres lavados con 10 ml de TE Buffer. Estos lavados se realizaron a 50°C y con agitación (150-175 rpm).
- Digestión del ADN. Para ello, se cortó un trozo (inserto) del bloque de agarosa que se sumergió en una solución de Buffer H (Fermentas) (10 µl de Buffer H + 90 µl de agua miliQ estéril) para realizar la preincubación a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente se continuó con la digestión de los insertos utilizando 10 U/µl de la enzima *Xba I* (Fermentas), incubándose a 37°C durante un mínimo de tres horas.
- Preparación del gel de agarosa. Se utilizó “Seakem Gold agarose” (Laboratorios Conda) al 1% en tampón TBE 0,5X (Tris-Borate EDTA Buffer, Scharlab, Barcelona, España). Se atemperó a 55°C antes de su utilización. Se colocaron los insertos en los extremos del peine colocando posteriormente este peine en el molde para el gel.
- Electroforesis en el equipo Cheff DR III (Bio-Rad Laboratories). Se llenó la cubeta de electroforesis con dos litros de tampón TBE 0,5X (Scharlab) y se ajustó la temperatura a 14°C. Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron las siguientes:
 - Pulso inicial: 2,2
 - Pulso final: 54,2
 - Voltaje: 6 V
 - Ángulo de inclinación: 120°
 - Tiempo: 21 horas
- Tinción del gel. Se llevó a cabo al finalizar la electroforesis en un baño con 10 mg/ml de Bromuro de etidio (AppliChem) durante al menos 30 minutos y posteriormente, se sumergió el gel en agua destilada al menos una hora. Se observaron los resultados exponiendo el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories). Se realizó la captura de la imagen mediante el equipo Molecular Imager GelDoc XR System (Bio-Rad Laboratories).
- Análisis de imágenes y posterior obtención de dendrogramas mediante el uso del software GelCompar II 6.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgica).

2.2. STEC no-O157

2.2.1. Caracterización fenotípica

La capacidad para fermentar la lactosa y el sorbitol de las cepas STEC no-O157 se investigó en la forma descrita para las cepas STEC O157:H7.

2.2.2. Detección de genes mediante PCR

Los genes investigados (PCR) en los aislados de STEC no-O157 se detallan en la Tabla II. 5. Se investigaron:

- Genes que codifican para las toxinas Shiga *stx1* (Pollard et al., 1990) y *stx2* (Olsen et al., 1995) y sus subtipos (Scheutz et al., 2012).
- Gen que codifica para la Intimina (*eae*) (Oswald et al., 2000).
- Gen que codifica para la Enterohemolisina (*ehxA*) (Wang et al., 2002).
- Genes que codifican la Subtilasa (*SubAB*) (Paton et al., 2004) y sus dos variantes alélicas (*SubAB₁* y *SubAB₂*) (Michelacci et al., 2013), la adhesina autoaglutinante (*saa*) (Paton & Paton, 2002) y el “toxigenic invasión loci A” (*tia*) (Tozzoli et al., 2010).

Tabla II.5. Genes investigados (PCR) para la caracterización de las cepas STEC no-O157.

Diana	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb) ^a	Referencia	Condiciones PCR ^b
<i>stx1</i>	VT1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	(Pollard et al., 1990)	A
	VT1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA			
<i>stx2</i>	SLTII1	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	448	(Olsen et al., 1995)	A
	SLTII2	GGATGCATCTCTGGTCATTG			
<i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881	(Oswald et al., 2000)	A
	SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG			
<i>EHEC</i>	HlyA-a	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG	569	(Wang et al., 2002)	A
<i>hlyA</i>	HlyA-b	TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC			
<i>subAB</i>	RTsubABF	GCAGATAAATACCCTTCACTTG	230	(Paton et al., 2004)	B
	RTsubABR	ATCACCAGTCCACTCAGCC			
<i>SubAB₁</i>	SubAF	GTACGGACTAACAGGGAAGT	1300	(Michelacci et al., 2013)	C
	RTsubABR	ATCACCAGTCCACTCAGCC			
<i>SubAB₂</i>	SubA-startF	CCCTGTAACATATTGACCAGCA	1200	(Michelacci et al., 2013)	
	RTsubABR	ATCACCAGTCCACTCAGCC			
<i>saa</i>	SAADF	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	(Paton & Paton, 2002)	D
	SAADR	ATGGACATGCCTGTGGCAAC			
<i>tia</i>	tia_lo	TCCATGCGAAGTTGTTATCA	580	(Tozzoli et al., 2010)	E
	tia_sense	TTCTCTTTTACCCTGCTTTTTC	(1800)		
<i>fliC</i>	FliCECF	CAAGTCATTAATA(A/C)AACAGCC	900-	(Machado et al., 2000)	A
	FliCECR	GACAT(A/G)TT(A/G)GA(G/A/C)ACTTC(G/C)GT	2600		
<i>stx1a</i>	stx1a-F1	CCTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478		
	stx1a-R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG			
<i>stx1c</i>	stx1c-F1	CCTTCTGGTACAACAGCGGTT	252		
	stx1c-R1	CAAGTGTGTACGAAATCCCTCTGA			
<i>stx1d</i>	stx1d-F1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203		
	stx1d-R1	CTCTTCTCTGGTTCTAACCCCATGATA			
<i>stx2a</i>	stx2a-F2	GCGATACTG(A/G)G(C/G/T)ACTGTGGCC	349		
	stx2a-R3	CCGKCAACCTTCACTGTAATGTG	347		
	stx2a-R2	GGCCACCTTCACTGTGAATGTG			
<i>stx2b</i>	stx2b-F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	251		
	stx2b-R1	CAGCAAATCTGAACCTGACG			
<i>stx2c</i>	stx2c-F1	GAAAGTCACAGTTTTATATAACAACGGGTA	177		F
	stx2c-R2	CCGGCCAC(C/T)TTTACTGTGAATGTA			
<i>stx2d</i>	stx2d-F1	AAA(A/G)TCACAGTCTTTATATAACAACGGGTG	179		
	stx2d-R1	TT(C/T)CCGGCCACTTTTACTGTG	280		
	stx2d-R2	GCCTGATGCACAGGTAAGTGGAC			
<i>stx2e</i>	stx2e-F1	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	411		
	stx2e-R2	CTTCCTGACACCTTACAGTAAAGGT			
<i>stx2f</i>	stx2f-F1	TGGGCGTCATCACTGGTTG	424		
	stx2f-R1	TAATGGCCGCCCTGTCTCC			
<i>stx2g</i>	stx2g-F1	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573		
	stx2g-R1	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT			

^a pb: Pares de bases

^b Condiciones de PCR de acuerdo a la Figura II.4.

En la Figura II.4. se presentan las condiciones de las distintas PCRs.

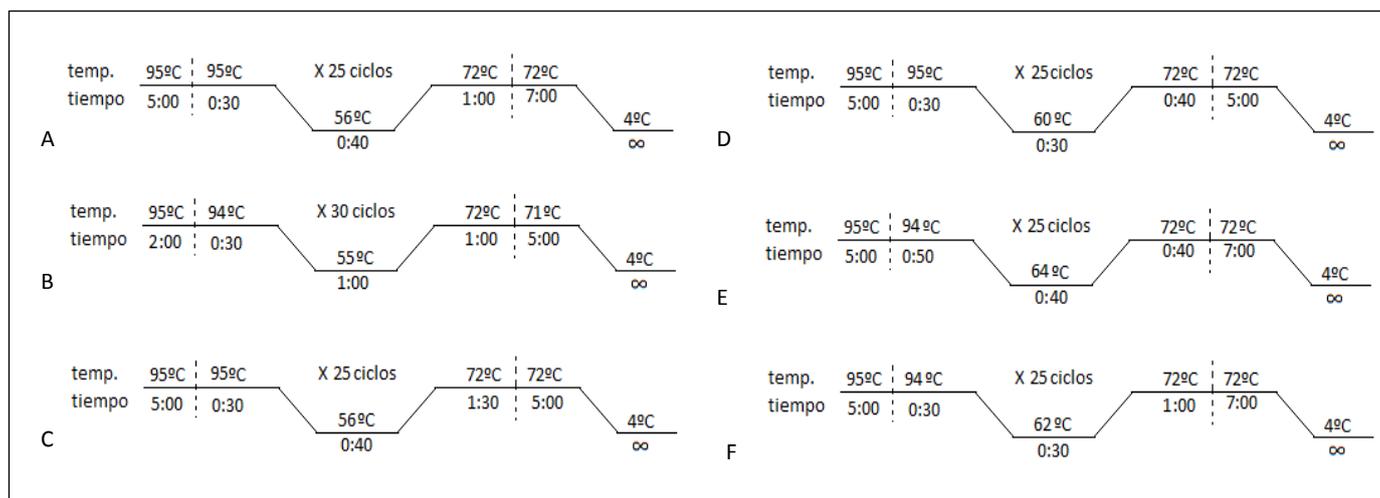


Figura II.4. Condiciones de las técnicas de PCR utilizadas para la detección de genes en cepas de STEC no-O157.

Además, se realizaron PCRs para la detección de los antígenos somáticos de seis serogrupos comúnmente asociados a enfermedad en el hombre: O45 (Lin et al., 2011), O26, O103, O111, O121 y O145 (Monday et al., 2007). También se investigaron los antígenos somáticos de los serogrupos: O104 (Bugarel et al., 2010) (asociado a un importante brote en Alemania y Francia en el año 2011), O91 (Perelle et al., 2004), O146 (Liu et al., 2007) y O128 (Lin et al., 2011) (de interés clínico y frecuente en cepas de ovino). Los cebadores utilizados en las correspondientes PCR se muestran en la Tabla II.6.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: en primer lugar, se realizó una desnaturalización a 95°C durante cinco minutos, seguida de 25 ciclos, cada uno de ellos con tres pasos; el primero, de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, el segundo de hibridación a 62°C durante 30 segundos y, el tercero, una elongación a 72°C durante un minuto. El paso final fue una elongación a 72°C durante siete minutos.

Para la amplificación se utilizó el equipo Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Life Technologies) y para la observación de resultados se procedió tal y como se ha descrito para las cepas O157:H7.

Tabla II.6. Cebadores utilizados en las pruebas de PCR para la detección de antígenos somáticos para las cepas STEC no-O157.

Serogrupo	Diana	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb) ^a	Referencia
O26	wzx	5'O26	ACTCTTGCTTCGCCTGTT	268	
		3'O26	CAGCGATACTTTGAACCTTAT		
O103	wzx	5'O103	TATCCTTCATAGCCTGTTGTT	320	
		3'O103	AATAGTAATAAGCCAGACACCTG		
O111	wzx	5'O111.3	GTTGCGAGGAATAATTCTTCA	829	(Monday et al., 2007)
		3'O111,2	CCATAGATATTGCATAAAGGC		
O121	wzx	5'O121	GTAGCGAAAAGGTTAGACTGG	651	
		3'O121	ATGGGAAAAGCTGATACTGC		
O145	wzx	5'O145.6	TTGAGCACTTATCACAAGAGATT	418	
		3'O145.B	GATTGAATAGCTGAAGTCATACTAAC		
O45	wzy	5'O45	TACGATTCACAAGCTTCCA	254	(Lin et al., 2011)
		3'O45	TGCAATCGCATAAGGAAATA		
O104	wzx	5'O104	TGTCGCGCAAAGAATTTCAAC ^b	99	(Bugarel et al., 2010)
		3'O104	AAAATCCTTTAAACTATACGCC		
O91	wzy	5'O91	CGATTTTCTGGAATGCTTGATG	105	(Perelle et al., 2004)
		3'O91	CAATACATAGTTTGATTTGTGTTTAAAGTTTAAAT		
O146	wzy	5'O146	ATTCGGGTAACGACCCTGTGTTGA	378	(Liu et al., 2007)
		3'O146	AGACTGCTAATGCAAGGAACATGG		
O128	wzx	5'O128	TCGATCGTCTTGTTTCAGTT	195	(Lin et al., 2011)
		3'O128	GAATGCAATGGGCAATTAAC		

^apb: Pares de bases

^bhebra complementaria

Las cepas positivas para alguno de estos serogrupos, se confirmaron mediante el uso de un antisuero comercial (Stanten Serum Institut -SSI Diagnostica-). Para ello, se tomó parte de una colonia en TSA (Becton Dickinson), se mezcló con el suero correspondiente y se observó la aglutinación. Cuando la cepa aglutinaba, se comprobó que no era autoaglutinante utilizando solución salina.

En las cepas en las que se detectaron alguno de los antígenos somáticos investigados, se buscó (PCR) el gen que codifica para el antígeno H (flagelar *fliC*) (Machado et al., 2000). Posteriormente, el resultado de estas PCR se purificó con el kit de purificación Invisorb® Fragment ClearUp (I. enzimanvitek) y se secuenció (Secuenciador 3730XL, Life Technologies). Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando los programas del software Lasergene Core Suite (DNASStar). El programa BLAST del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se utilizó para la comparación (alineamiento) de las secuencias en una base de datos de nucleótidos.

2.2.3. Resistencia a antibióticos

El protocolo seguido es el que se describió para las cepas STEC O157:H7 en el apartado 2.1.4 del material y métodos de este Capítulo.

2.2.4. Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

El protocolo seguido es el que se describió para las cepas STEC O157:H7 en el apartado 2.1.5 del material y métodos de este Capítulo aunque con una variación que consistía en lo siguiente: durante la electroforesis, se llenó la cubeta con dos litros de tampón TBE 0,5X (Scharlab) al que se le añadió tiourea (Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania) a una concentración final de 0,4 µl/ml. La tiourea evita la degradación del ADN durante la electroforesis.

RESULTADOS

1. GENES *stxs* EN LAS CEPAS CLÍNICAS

De los coprocultivos enviados a nuestro laboratorio por el Hospital de León, se aislaron cuatro cepas de *E. coli* STEC que fueron no-O157 (véase más adelante). Estas, sumadas a las 14 proporcionadas por el Instituto de Salud Carlos III (*E. coli* STEC O157) constituían una población de 18 cepas. La distribución de genes *stxs* en las cepas clínicas se presenta en la Tabla II.7.

Tabla II.7. Genes *stxs* en 18 cepas procedentes de coprocultivos del Hospital de León.

Cepas clínicas	Genotipo		
	<i>stx1+</i>	<i>stx2+</i>	<i>stx1+/stx2+</i>
18	3 (16,7%)	10 (55,5%)	5 (27,8%)

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE *E. coli* STEC DE ORIGEN OVINO

El sistema Api® 20E identificó las 50 cepas, procedentes de leche de tanque, como *E. coli* (41 -82%-), *Enterobacter cloacae* (4 -8%-), *Hafnia alvei* (2 -4%-), *Raoultella ornithinolytica* (1 -2%-), *Serratia liquefaciens* (1 -2%-) y *Pseudomonas aeruginosa* (1 -2%-).

De las 62 cepas de origen ovino (50 de leche de tanque y 12 medioambientales), cuatro (tres de leche y una del agua de bebida, obtenidas en diferentes explotaciones) fueron positivas en el Dryspot *E. coli* O157 test (Oxoid) y ninguna en el Dryspot *E. coli* Seroscreen (Oxoid).

3. CEPAS DE *E. coli* STEC O157:H7

Se estudiaron 18 cepas de *E. coli* O157:H7; de las cuales, cuatro eran de origen ovino y 14 clínicas cedidas por el Instituto de Salud Carlos III (coprocultivos aislados en el Hospital de León).

3.1. Confirmación y caracterización

La serotipificación por métodos convencionales confirmó que las cuatro cepas ovinas que fueron positivas en el Dryspot *E. coli* O157 test y las 14 facilitadas por el Instituto de Salud Carlos III presentaban el antígeno O157.

Todas ellas fermentaban la lactosa pero no el sorbitol, carecían de actividad β -glucuronidasa y producían enterohemolisina (Figura II.5).

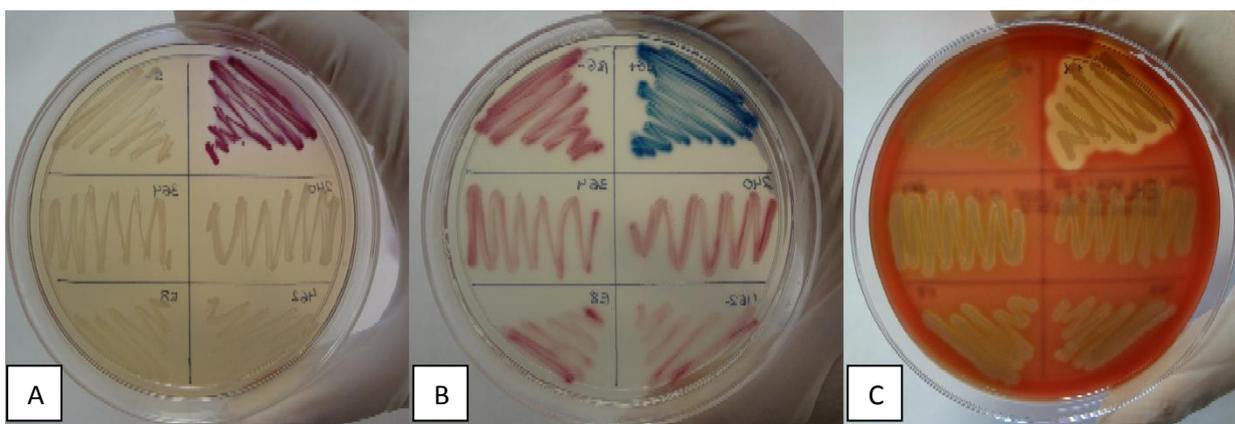


Figura II.5. Crecimiento de cepas en los medios SMAC (A), Chromocult coliform Agar (B) y Enterohaemolysin Agar (C). Las dos siembras superiores corresponden a cepas sorbitol negativo (izquierda) y sorbitol positivo (derecha) (A); β -glucuronidasa negativo (izquierda) y positivo (derecha) (B); enterohemólisis (izquierda) y α -hemólisis (derecha) (C).

3.2. Detección de genes mediante PCR

Las 18 cepas presentaron los genes que codifican para los antígenos somático O157 (*O157rfbE*) y flagelar H7 (*fliCh7*), el gen que codifica para la intimina (*eae*) y su variante *eaey1*, el plásmido pO157 (*Pcvd419*) y el gen que codifica para la enterohemolisina (*exhA*).

Del total, 13 cepas (72,2%) poseían el gen *stx2* (entre ellas, las de origen ovino) y cinco (27,8%) el *stx1* y el *stx2*. Entre estas últimas, tres (60%) presentaban el subtipo *stx2c*, una (20%) el subtipo *stx2a* y la restante (20%) los subtipos *stx2a* y *stx2c*. En todas las cepas que presentaban el gen que codifica para la toxina Stx1 se detectó el subtipo *stx1a*. Las cepas que poseían únicamente el gen que codifica para la toxina Stx2 eran del subtipo *stx2c*.

En la Tabla II.8 y la Figura II.6 se resumen los subtipos de genes que codifican para las toxinas Shiga (*stxs*) presentes en las 18 cepas de *E. coli* O157:H7.

Tabla II.8. Distribución de las 18 cepas de *E. coli* O157:H7 en función de los subtipos de genes *stxs* que presentaban.

Total cepas O157:H7	Subtipos de genes <i>stx</i>			
	<i>stx1a+stx2a</i>	<i>stx1a+stx2c</i>	<i>stx1a+stx2a+stx2c</i>	<i>stx2c</i>
18	1 (5,5%)	3 (16,8%)	1 (5,5%)	13 (72,2%)

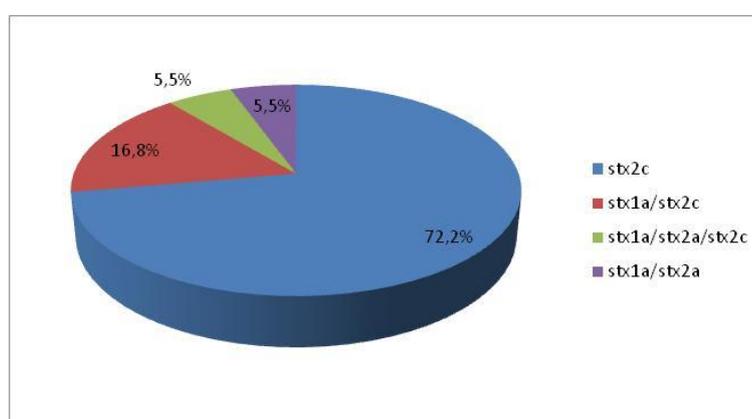


Figura II.6. Representación gráfica de la distribución de los subtipos de genes *stxs*.

3.3. Fagotipado

Las cuatro cepas de origen ovino y tres de las de origen humano pertenecían al fagotipo 54 (38,9%). El resto pertenecían a los fagotipos 8 (16,7%), 14 (11,2%), 32 (11,2%), 34 (5,5%), 70 (5,5%) y 71prov (5,5%). Una de las cepas presentó un patrón de lisis no reconocible (PNR) (Figura II.7).

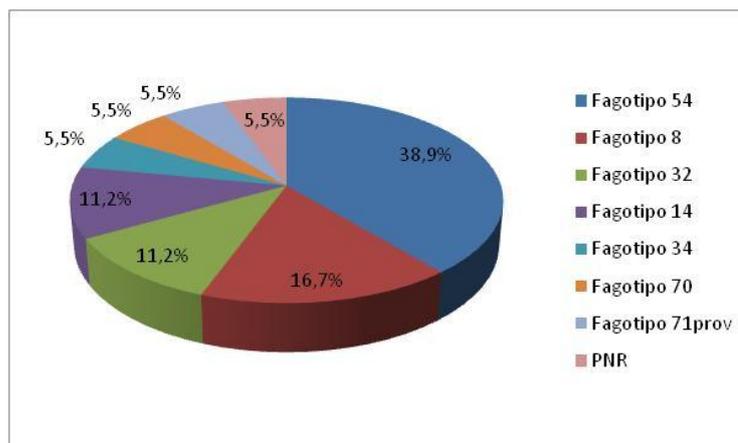


Figura II.7. Representación gráfica de la distribución de las cepas O157:H7 en función de su fagotipo.

3.4. Resistencia a antimicrobianos

Ninguna de las cepas de origen ovino mostró resistencia a los antimicrobianos ensayados. Sin embargo, siete de las cepas de origen humano presentaron resistencia a uno o más de estos compuestos. En la Tabla II.9 se presentan estos datos.

Tabla II.9. Resistencia de siete cepas de *E. coli* O157:H7.

CEPA	Antimicrobianos ^a
2818/09	NA
3360/09	TE
3361/09	TE
3362/09	TE
3697/10	S, NA, TE, SXT, C, S3
4594/10	S, TE, SXT, S3
3643/11	S, S3

^aNA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; S, estreptomina; SXT, trimetoprim sulfametoxazol; C, cloranfenicol; S3, “compound sulphonamides”.

En estas siete cepas se buscó el determinante que confería la resistencia (Tabla II.10).

Tabla II.10. Resistencias a antimicrobianos y determinantes de la resistencia en siete cepas de *E. coli* O157:H7.

CEPA	ANTIMICROBIANOS ^a					
	S	NA	TE	SXT	C	S3
2818/09		<i>gyrA</i> mutación QRDR				
3360/09			<i>tetA</i>			
3361/09			<i>tetA</i>			
3362/09			<i>tetA</i>			
3697/10	<i>aadA1</i>	<i>gyrA</i> mutación QRDR	<i>tetA</i>	<i>dfrA1</i>	<i>CatA1</i>	<i>sul1</i>
4594/10	<i>aadA1</i>		<i>tetA</i>	<i>dfrA1</i>		<i>sul1</i>
3643/11	<i>strA/strB</i>					<i>sul2</i>

^aS, estreptomycin; NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; SXT, trimetoprim sulfametoxazol; C, cloranfenicol; S3, “compound sulphonamides”.

3.5. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

El genotipado de las 18 cepas de *E. coli* O157:H7 dio lugar a 17 patrones de bandas diferentes. Con al menos un 86,4% de similitud, se pudieron diferenciar tres “clusters” o pulsotipos (Figura II. 8). En esta Figura, se proporciona también información acerca del origen, los subtipos de los genes *stxs*, los fagotipos y la resistencia a antimicrobianos de cada una de las cepas.

El **pulsotipo I** incluía cuatro cepas de origen humano, tres de ellas con un mismo perfil de genes de virulencia (*stx1a*, *stx2c*). Todas excepto una (3697/10) pertenecían al fagotipo 8 y dos de ellas eran resistentes a varios antimicrobianos.

Con un 88,2% de similitud, el **pulsotipo II** estaba formado por ocho cepas (cuatro de origen ovino y cuatro clínicas). Las de origen ovino (M240VO, M364VO, M462VO y F8VO) presentaban un 90,1% de similitud con dos de las cepas clínicas (3535/09 y 3147/10). Todas ellas presentaban el mismo perfil de genes de virulencia (*stx2c*). Por lo que respecta al fagotipo, las cepas de origen ovino pertenecían al fagotipo 54 y las de origen humano a diversos fagotipos. Ninguna era resistente a los antimicrobianos ensayados.

Las cepas de origen ovino se agruparon con un 92,6% de similitud. La cepa de agua de bebida (F8VO) procedente de una explotación presentaba un 97,4% de similitud con una cepa de leche de tanque (M364VO) aislada en una explotación diferente.

El **pulsotipo III** estaba constituido por tres cepas de origen humano aisladas en el año 2009 (3360/09, 3361/09 y 3362/09). Estas presentaban un 94,4% de similitud, mostrando dos de ellas (3360/09 y 3362/09) un perfil idéntico. Además, poseían los mismos genes de virulencia (*stx2c*), el mismo fagotipo (54) y eran resistentes a la tetraciclina debido a la presencia del gen *tetA*.

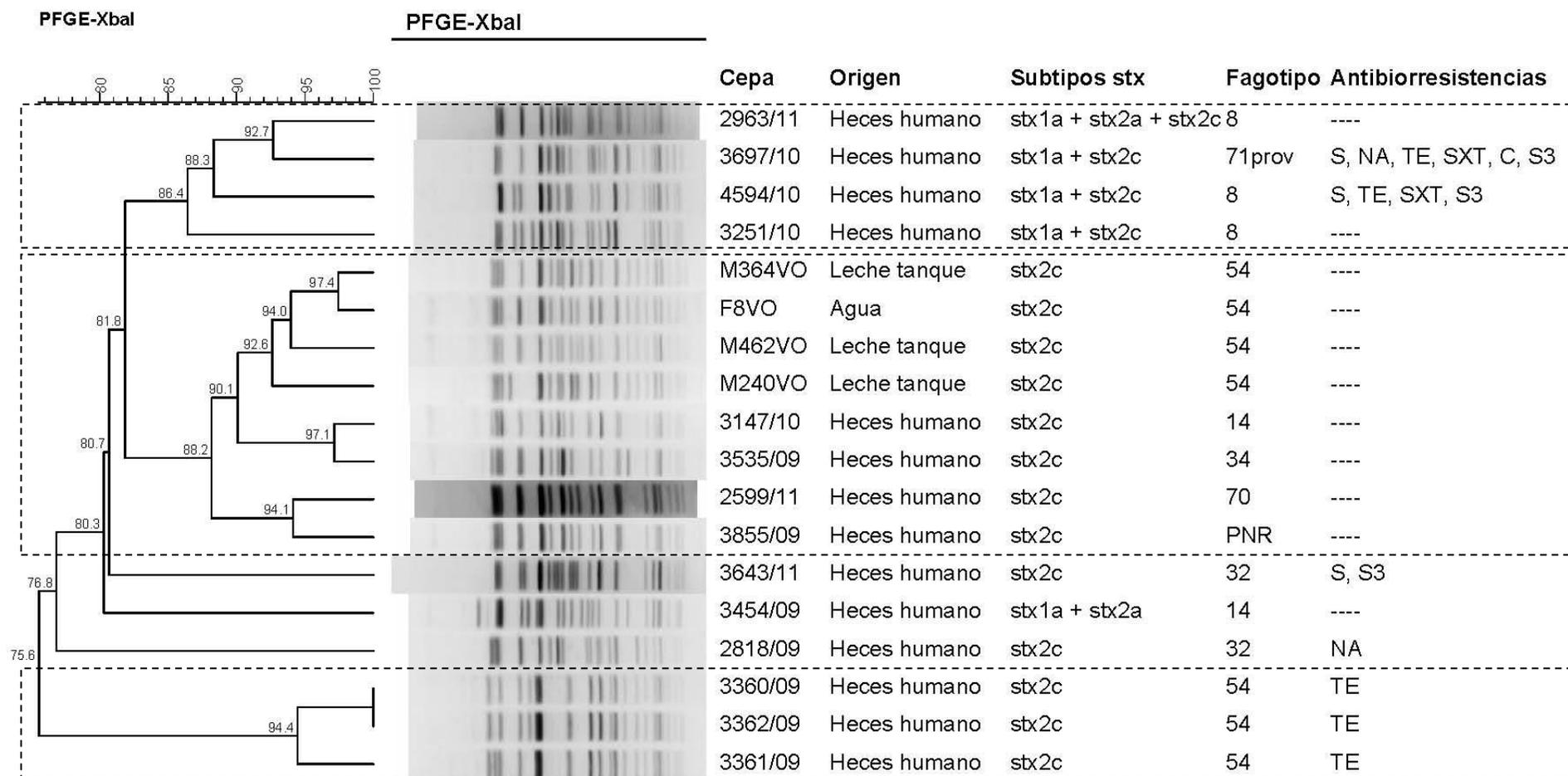


Figura II.8. Dendrograma *XbaI*-PFGE que muestra la relación genética entre las 18 cepas de *E. coli* O157:H7 de origen ovino y humano. También proporciona información acerca de los subtipos de *stxs*, fagotipos y resistencia a antimicrobianos.

4. CEPAS DE *E. coli* STEC NO-O157

Se estudiaron 62 cepas de *E. coli* STEC no-O157. De ellas, 58 (93,5%) eran de origen ovino y cuatro (6,5%) fueron aisladas por nosotros de los coprocultivos proporcionados por el Hospital de León. Entre las primeras, 47 (81,1%) procedían de muestras de leche de tanque, 10 (17,2%) de muestras de heces de oveja y una (1,7%) del agua de bebida de una explotación.

4.1. Caracterización fenotípica

De las 62 cepas estudiadas, 39 (62,9%) fermentaron la lactosa y 23 (37,1%) no lo hicieron. Para el sorbitol, 19 (30,6%) fueron positivas y 43 (69,4%) negativas.

4.2. Detección de genes mediante PCR

En esta población, 50 cepas (80,7%) poseían sólo el gen *stx1*, una (1,6%) el gen *stx2* y 11 (17,7%) ambos.

En cuanto a los subtipos de genes *stxs* (Tabla II.11); de las 61 cepas que albergaban el gen *stx1*, 57 (93,5%) presentaron el subtipo *stx1c* y cuatro (6,5%) el subtipo *stx1a*. Las 12 cepas que poseían el gen *stx2* pertenecían al subtipo *stx2b*.

Tabla II.11. Distribución de las cepas de *E. coli* STEC no-O157 en función de los subtipos de genes *stxs* que poseían.

Total cepas no-O157	Subtipos de genes <i>stx</i>			
	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx2b</i>	<i>stx1c+stx2b</i>
62	4 (6,5%)	46 (74,2%)	1 (1,6%)	11 (17,7%)

El gen que codifica para la intimina (*eae*) se halló en cuatro (6,5%) cepas que poseían también el subtipo *stx1a*. Dos procedían de muestras de leche de tanque y dos de pacientes. Todas las cepas salvo una poseían el gen *exhA*. En la Figura II.9 se presenta la distribución de las cepas de acuerdo con la presencia de los genes *eae*, *exhA*, *stxs* y los subtipos de estos últimos.

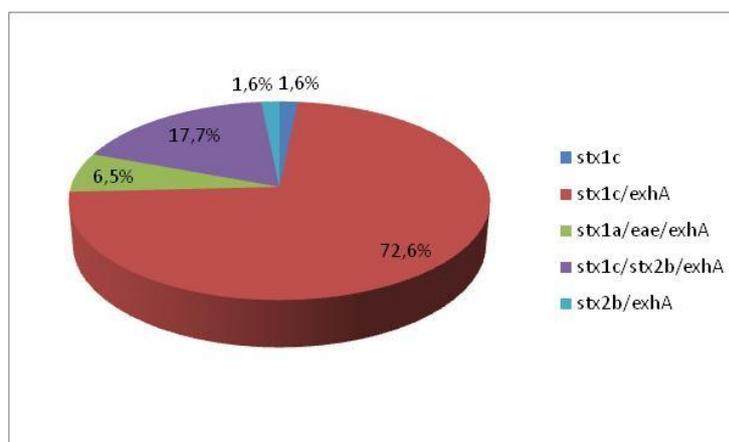


Figura II.9. Distribución de las cepas de *E. coli* STEC no-O157 en función de la presencia de los genes *eae*, *exhA*, *stxs* y los subtipos de estos últimos.

Un total de 25 cepas (40,3%) poseían el gen que codifica para la subtilasa (*SubAB*) (21 procedían de muestras de leche de tanque, tres de heces de ovino y una de pacientes). De ellas, 17 (68%) presentaban la variante *SubAB*₂ y 21 (84%) el “toxigenic invasión loci A” (*tia*). Ambos genes se hallaron juntos en 13 cepas (Tabla II.12). Ninguna de las cepas presentó el gen que codifica para la otra variante alélica de la subtilasa ni la adhesina autoaglutinante (*saa*).

Tabla II.12. Distribución de las cepas de *E. coli* STEC no-O157 positivas al gen que codifica para la subtilasa (*SubAB*) en función de la presencia de su variante alélica *SubAB*₂ y del “toxigenic invasión loci A” (*tia*).

Cepas no-O157 <i>SubAB</i> ⁺	<i>SubAB</i> ₂	<i>tia</i>	<i>SubAB</i> ₂ + <i>tia</i>
25	4 (16%)	8 (32%)	13 (52%)

Cuando los antígenos se investigaron mediante PCR, se detectó, en tres cepas, el antígeno O146 y, en una, el antígeno O26. En ellas se buscó y secuenció el gen que codifica para el antígeno flagelar H (flagelar *fliC*), identificando los siguientes serotipos:

- O146:H21: Las tres cepas de este serotipo procedían, dos de leche y una de un paciente.
- O26:H11: Una cepa clínica.

Como no se pudo determinar el serogrupo de las otras dos cepas clínicas (C74VO y C180VO), éstas se enviaron al Staten Serum Institute (Copenhague,

Dinamarca) para su serotipificación convencional. La cepa C74VO pertenecía al serotipo O176:H- y la C180VO al O98:H-.

4.3. Resistencia a antimicrobianos

Se investigó la sensibilidad de las 62 cepas de *E. coli* STEC no-O157. Nueve de ellas mostraron resistencia a uno o más de los antimicrobianos ensayados. Seis procedían de muestras de leche y las otras tres de muestras de heces ovinas. En la Tabla II.13 se indican las cepas resistentes y los compuestos correspondientes.

Tabla II.13. Perfil de resistencia a antimicrobianos de nueve cepas de *E. coli* STEC No-O157.

CEPA	Antimicrobianos ^a
M208VO	S, TE, S3
M279aVO	AMP, S, S3
M279bVO	AMP, S, S3
M298VO	AMP, KF, C
M299VO	C
M329VO	KF
F1VO	S, TE, S3
F3VO	AMP, KF, AMC, FOX, CEC
F6VO	S, TE, S3

^aS, estreptomycin; TE, tetraciclina; S3, “compound sulphonamides”; AMP, ampicilina; KF, cefalotina; C, cloranfenicol; AMC, amoxicilina – ácido clavulánico; FOX, cefoxitina; CEC, cefaclor.

Los antimicrobianos frente a los que se encontraron mayor resistencia fueron estreptomycin y sulfamidas, con un total de cinco cepas, seguidos por la ampicilina, con cuatro, y la tetraciclina y cefalotina con tres. Se encontraron además dos cepas resistentes al cloranfenicol y una a la amoxicilina–ácido clavulánico, a la cefoxitina y al cefaclor.

En todas ellas se investigaron los determinantes que conferían la resistencia a estos antimicrobianos (Tabla II.14).

Tabla II.14. Resistencias a antimicrobianos y determinantes de la resistencia en nueve cepas de *E. coli* STEC no O157:H7.

CEPA	ANTIBIÓTICOS								
	AMP ^a	S	KF	TE	AMC	C	S3	FOX	CEC
M208VO		<i>strA/strB</i>		<i>tetA</i>			<i>sul2</i>		
M279aVO	TEM-1b	<i>strA/strB</i>					<i>sul2</i>		
M279bVO	TEM-1b	<i>strA/strB</i>					<i>sul2</i>		
M298VO	Porinas		Porinas			Porinas			
M299VO						Porinas			
M329VO			Porinas						
F1VO		<i>strA/strB</i>		<i>tetB</i>			<i>sul2</i>		
F3VO	AmpC i.		AmpC i.		AmpC i.			AmpC i.	AmpC i.
F6VO		<i>strA/strB</i>		<i>tetB</i>			<i>sul2</i>		

^aAMP, ampicilina; S, estreptomycin; KF, cefalotina; TE, tetraciclina; AMC, amoxicilina – ácido clavulánico; C, cloranfenicol; S3, “compound sulphonamides”; FOX, cefoxitina; CEC, cefaclor.

4.4. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

El genotipado de las 62 cepas de *E. coli* STEC no-O157 dio lugar a 40 patrones de bandas. Con un porcentaje de similitud $\geq 72\%$, las cepas se agruparon en cinco “clusters” o pulsotipos que se muestran en la Figura II.10, y cuyas características principales se resumen en la Tabla II.15.

- El **pulsotipo I** incluía 42 cepas de origen ovino, 35 aisladas de leche de tanque y siete de heces de oveja. Un total de 29 cepas obtenidas de leche mostraban pulsotipos idénticos que agrupaban entre dos y cinco cepas. Algunas procedían de la misma muestra de leche pero con distinto fenotipo; sin embargo, otras se habían aislado en diferentes explotaciones.
- El **pulsotipo II** estaba formado por siete cepas; dos de origen humano, dos de heces de ovino y tres de leche de tanque. Cuatro de ellas (tres de leche y una de heces de oveja) presentaban los mismos genes de virulencia.
- El **pulsotipo III** contenía cinco cepas, cuatro de leche y una clínica. Las cepas aisladas de leche presentaban un mismo perfil de genes de virulencia pero diferente perfil de resistencia a antimicrobianos.

- El **pulsotipo IV** agrupaba cuatro cepas; tres de leche y una de agua.
- El **pulsotipo V** estaba formado por dos cepas aisladas de leche de tanque.

Las dos cepas restantes no pudieron ser incluidas en ningún “cluster”; una de ellas, (C180V0) procedía de un paciente y la otra (F3VO), que fue aislada de heces de ovino, era resistente a cinco antimicrobianos debido a la presencia de la β -lactamasa AmpC inducible.

Capítulo II. Resultados

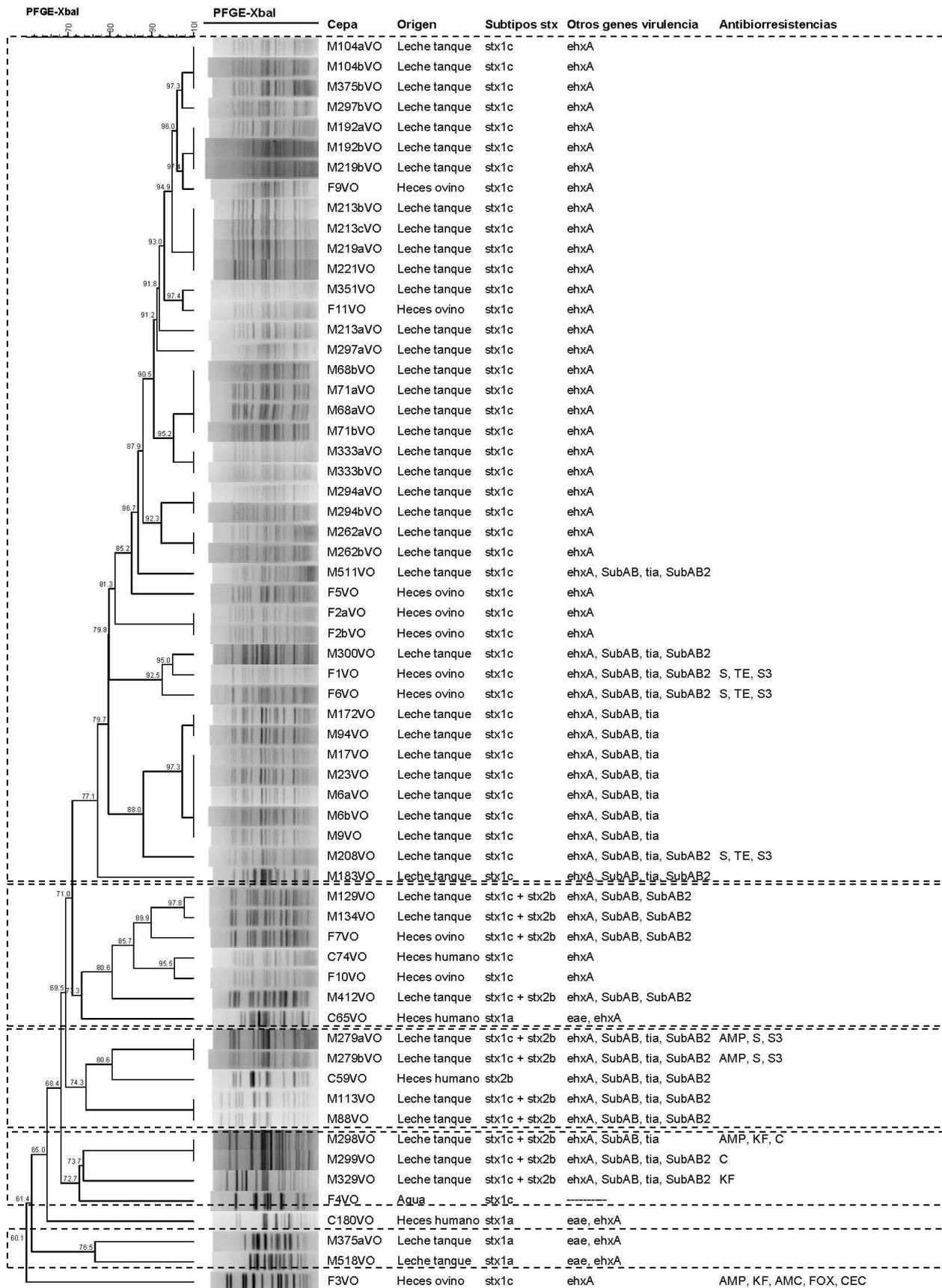


Figura II.10. Dendrograma XbaI-PFGE que muestra la relación genética entre las 62 cepas de *E. coli* STEC no-O157:H7 de origen ovino y humano. También proporciona información acerca de los subtipos de stxs y otros genes de virulencia.

Tabla II.15. Características principales de las cepas STEC no-O157.

Cepa	Origen	Explotación	Enriquecimiento	Lactosa	Sorbitol	Genes <i>stx</i>	Subtipos genes <i>stx</i>	Otros genes de virulencia	Serotipo	Pulsotipo
M6aVO	Leche tanque	13	<i>stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia</i>		I
M6bVO	Leche tanque	13	<i>stx2</i>	+	+	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia</i>		I
M9VO	Leche tanque	14	<i>stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia</i>		I
M17VO	Leche tanque	18	<i>stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia</i>		I
M23VO	Leche tanque	22	<i>stx1/stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia</i>		I
M68aVO	Leche tanque	64	<i>stx1/stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M68bVO	Leche tanque	64	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M71aVO	Leche tanque	66	<i>stx1/stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M71bVO	Leche tanque	66	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M88VO	Leche tanque	119	<i>stx2</i>	+	+	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>	O146:H21	III
M94VO	Leche tanque	125	<i>stx1</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia</i>		I
M104aVO	Leche tanque	145	<i>stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M104bVO	Leche tanque	145	<i>stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M113VO	Leche tanque	157	<i>stx2</i>	+	+	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>	O146:H21	III
M129VO	Leche tanque	224	<i>stx1</i>	+	+	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/SubAB₂</i>		II
M134VO	Leche tanque	227	Negativo	+	+	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/SubAB₂</i>		II
M172VO	Leche tanque	372	Negativo	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia</i>		I
M183VO	Leche tanque	379	<i>stx1</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		I
M192aVO	Leche tanque	42	<i>stx1</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M192bVO	Leche tanque	42	<i>stx1</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M208VO	Leche tanque	54	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		I
M213aVO	Leche tanque	57	<i>stx1/stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M213bVO	Leche tanque	57	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M213cVO	Leche tanque	57	<i>stx1/stx2</i>	-	+	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M219aVO	Leche tanque	70	<i>stx1</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M219bVO	Leche tanque	70	<i>stx1</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M221VO	Leche tanque	71	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M262aVO	Leche tanque	111	<i>stx1/stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M262bVO	Leche tanque	111	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M279aVO	Leche tanque	161	<i>stx2</i>	+	-	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		III
M279bVO	Leche tanque	161	<i>stx2</i>	-	-	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		III
M294aVO	Leche tanque	171	<i>stx1</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I

Tabla II.15. (Continuación). Características principales de las cepas STEC no-O157.

Cepa	Origen	Explotación	Enriquecimiento	Lactosa	Sorbitol	Genes <i>stx</i>	Subtipos genes <i>stx</i>	Otros genes de virulencia	Serotipo	Pulsotipo
M294bVO	Leche tanque	171	<i>stx1</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M297aVO	Leche tanque	173	<i>stx1/stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M297bVO	Leche tanque	173	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M298VO	Leche tanque	173	<i>stx1/stx2</i>	+	+	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/tia</i>		IV
M299VO	Leche tanque	173	<i>stx1/stx2</i>	+	+	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		IV
M300VO	Leche tanque	174	Negativo	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		I
M329VO	Leche tanque	185	<i>stx2</i>	+	+	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		IV
M333aVO	Leche tanque	187	<i>stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M333bVO	Leche tanque	187	<i>stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M351VO	Leche tanque	198	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M375aVO	Leche tanque	217	Negativo	+	+	<i>stx1</i>	<i>stx1a</i>	<i>eae/ehxA</i>		V
M375bVO	Leche tanque	217	Negativo	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
M412VO	Leche tanque	245	<i>stx1/stx2</i>	+	+	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/SubAB₂</i>		II
M511VO	Leche tanque	356	<i>stx1/stx2</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		I
M518VO	Leche tanque	359	<i>stx1</i>	+	+	<i>stx1</i>	<i>stx1a</i>	<i>eae, ehxA</i>		V
F1VO	Heces ovino (p) ^a	42	<i>stx1</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		I
F2aVO	Heces ovino (p)	64	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
F2bVO	Heces ovino (p)	64	<i>stx1/stx2</i>	-	+	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
F3VO	Heces ovino (p)	173	<i>stx1/stx2</i>	+	+	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		NA ^c
F4VO	Agua (p)	71	<i>stx1/stx2</i>	+	+	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>			IV
F5VO	Heces ovino (p)	187	<i>stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
F6VO	Heces ovino (v) ^b	42	<i>stx1</i>	+	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>		I
F7VO	Heces ovino (v)	42	<i>stx1</i>	+	+	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1c/stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/SubAB₂</i>		II
F9VO	Heces ovino (v)	57	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
F10VO	Heces ovino (v)	64	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		II
F11VO	Heces ovino (v)	173	<i>stx1/stx2</i>	-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>		I
C59VO	Heces humano			+	+	<i>stx2</i>	<i>stx2b</i>	<i>ehxA/SubAB/tia/SubAB₂</i>	O146:H21	III
C65VO	Heces humano			+	+	<i>stx1</i>	<i>stx1a</i>	<i>eae, ehxA</i>	O26:H11	II
C74VO	Heces humano			-	-	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>ehxA</i>	O176:H-	II
C180VO	Heces humano			+	+	<i>stx1</i>	<i>stx1a</i>	<i>eae, ehxA</i>	O98:H-	NA

^a(p)muestreo de primavera/ ^b(v)muestreo de verano/ ^cNA: Cepa no agrupada en ningún "cluster".

DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *E. coli* STEC

El aislamiento e identificación de cepas de *E. coli* a partir de alimentos y otras muestras es un proceso sencillo que incluye la siembra en medios conteniendo lactosa y su posterior caracterización bioquímica, utilizando técnicas convencionales o sistemas comerciales como las galerías Api® 20E (BioMerieux). Sin embargo, los fenotipos de las cepas pertenecientes a los grupos patógenos de interés como agentes de infecciones alimentarias, presentan variaciones en relación con la cepa tipo de esta especie (Elizaquível et al., 2011). Por tanto, no es extraño que las galerías Api® 20E utilizadas adscribieran nueve de nuestras cepas, aisladas de leche de tanque, a géneros y especies de bacterias Gram-negativas diferentes de *E. coli*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las 50 cepas de leche de oveja, se consideró que no era de interés la caracterización bioquímica de las otras 30 cepas incluidas en este Capítulo (12 obtenidas del “medio ambiente” de las explotaciones y 18 procedentes de muestras clínicas).

En el caso del Dryspot *E. coli* O157 test (Oxoid), éste fue útil para la detección de cepas de *E. coli* O157, ya que las cuatro, de origen ovino, que fueron positivas en esta prueba, se confirmaron posteriormente con el antisuero del “Stanten Serum Institut” y, además, poseían el gen que codifica para el antígeno somático O157 (*O157rfbE*).

2. CEPAS DE *E. coli* O157:H7

El fenotipo de las 18 cepas de *E. coli* O157:H7 (14 clínicas, tres de leche y una de agua) era típico ya que todas ellas fermentaban la lactosa, no fermentaban el sorbitol, carecían de actividad β -glucuronidasa y producían enterohemolisina, confirmada por la presencia del gen que codifica para ésta (*exhA*). Poseían también otros genes asociados con este serotipo como son los que codifican para las toxinas Shiga, los que codifican para los antígenos somáticos O157 (*O157rfbE*) y flagelar H7 (*fliCh7*), el que codifica para la intimina (*eae*) y su variante *eaey1* y el plásmido pO157 (*Pcvd419*) (Paton & Paton, 1998; Gyles, 2007).

En cuanto a los genes que codifican para las toxinas Stxs, todas las cepas poseían el gen *stx2*. La mayoría, incluidas las cuatro obtenidas de explotaciones ovinas, albergaban únicamente este gen y ninguna poseía sólo el gen que codifica para la toxina Stx1. Esto coincide con los resultados obtenidos en otros trabajos en los que se caracterizaron cepas de *E. coli* O157:H7 de origen ovino y humano (Heuvelink et al., 1998; Chapman et al., 2001; Blanco et al., 2003; Rey et al., 2003; Mora et al., 2004; Caro et al., 2006; Oporto et al., 2008).

Considerando los subtipos de los genes *stxs*, las cuatro cepas de origen ovino (pulsotipo II, Figura II.8) y nueve de origen humano (cuatro de ellas también agrupadas en el pulsotipo II) mostraban el subtipo *stx2c*. Este subtipo acompañado del *stx1a* se detectó en cuatro cepas humanas (pulsotipo I), presentando una de ellas, además, el subtipo *stx2a*. La cepa clínica restante era *stx1a+/stx2a+*. Desde el punto de vista clínico, el perfil genético *stx2* en cepas de *E. coli* O157:H7, especialmente si va acompañado del gen *eae*, tiene mayor probabilidad de producir SUH que las que presentan el gen que codifica para la toxina Stx1 o las que producen ambas toxinas. De hecho, los subtipos *stx2a*, *stx2c* y *stx2d* son los asociados más frecuentemente con procesos humanos graves (Gyles, 2007; Bergan et al., 2012; Farrokh et al., 2013).

Por lo que respecta a la fagotipia, las cepas de origen ovino y tres cepas clínicas pertenecían al fagotipo 54. El resto pertenecían a los fagotipos 8, 14, 32, 34, 70 y 71prov, presentando una de ellas un patrón de lisis no reconocible (PNR). En trabajos similares realizados en nuestro país, el fagotipo 54 se detectó con frecuencia en cepas de origen ovino (Rey et al., 2003; Mora et al., 2004) aunque entre las aisladas en otras áreas geográficas (Holanda y Reino Unido), su presencia era muy escasa e incluso inexistente (Heuvelink et al., 1998; Chapman et al., 2001). Los fagotipos de las cepas clínicas coincidieron, en general, con los hallados en otros estudios (Heuvelink et al., 1998; Chapman et al., 2001; Mora et al., 2004). Las cepas del fagotipo 54 presentaban el mismo perfil de genes *stxs* (*stx2c*) aunque no pertenecían al mismo pulsotipo (las cepas de origen ovino se agrupaban dentro del pulsotipo II y las de origen humano constituían el III). Esto confirma que, como para otras bacterias; por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, el fagotipado tiene menor capacidad de discriminación que la técnica PFGE aunque la combinación de ambos métodos se considera complementaria

y adecuada tanto para la subtipificación de cepas de *E. coli* O157:H7 como para determinar el reservorio de las cepas (Mora et al., 2004). Algunos fagotipos de cepas *stx2+* y *stx2c+* como el 21/28, el 2 y el 8 se asocian, al menos en el Reino Unido e Irlanda, con el desarrollo de SUH en pacientes, ocupando las cepas del fagotipo 8 el segundo lugar entre los casos declarados en Inglaterra y Gales (EFSA, 2007). En este estudio tres de las cuatro cepas clínicas del pulsotipo I (Figura II.8) eran *stx2c+* y pertenecían al fagotipo 8.

En cuanto a la resistencia a los antimicrobianos, únicamente cepas clínicas (siete) fueron resistentes a uno o más de los compuestos ensayados, lo que sugiere que los pacientes habían recibido algún tipo de tratamiento previo. Hay que resaltar que tres de ellas eran multirresistentes. Este porcentaje (38,9%) es superior al obtenido en estudios similares (Meng et al., 2013).

Por lo que respecta a los determinantes que conferían la resistencia (Tabla II.10), hay que señalar lo siguiente: para las tres cepas resistentes a la **estreptomicina**, en dos de ellas (3697/10 y 4594/10) se detectó un integrón de clase I conteniendo la casete genética de resistencia a antibióticos con los genes *aadA1* (confieren resistencia a la estreptomicina) y *dfrA1* (resistencia al trimetoprim sulfametoxazol). Además estos integrones de clase I poseen en el extremo 3' un segmento conservado (3'CS) que incluye el gen *sul1* que confiere resistencia a sulfamidas (Levesque et al., 1995). En la cepa restante (3643/11) se detectaron los genes *strA* y *strB* que codifican para fosfotransferasas que fosforilan aminoglicósidos confiriendo así la resistencia a este antibiótico. Las cepas resistentes al **ácido nalidíxico** lo fueron debido a la presencia de una mutación en el gen que codifica para la subunidad A de la ADN-girasa (*gyrA*). Esta enzima constituye la diana primaria de las quinolonas, entre las que se encuentra el ácido nalidíxico. Las dos cepas presentaban una mutación en un aminoácido presente en la denominada "Quinolone resistance determinant región" (QRDR) del gen *gyrA*, que en el caso de *E. coli* va del codón 67 al 106 (Griggs et al., 1996). La mutación presente en ambas cepas fue la misma, Ser83→ Leu. La resistencia a la **tetraciclina** fue debida, en todos los casos, a la presencia del gen *tetA*. Este gen codifica para una proteína que constituye una bomba de expulsión de tetraciclinas asociada a la membrana. La resistencia al **cloranfenicol** de la cepa 3697/10 era debida a una

inactivación enzimática del antibiótico por la presencia del gen *CatA1* que codifica para una cloranfenicol acetil transferasa. Finalmente, la resistencia a **sulfamidas** se debió, en la cepa 3643/11, a la presencia del gen *sul2*, que en muchos casos precede a los genes *strA* y *strB* presentes también en esta cepa (Bean et al., 2009). En las cepas 3697/10 y 4594/10, como ya se ha señalado, la resistencia se debió a la presencia del gen *sul1* asociado al integrón de clase I. Los genes *sul1* y *sul2* codifican formas resistentes de la dihidropteroico sintetasa.

De los tres “clusters” o pulsotipos hallados al aplicar la técnica PFGE, dos (I y III) estaban integrados exclusivamente por cepas clínicas, algunas idénticas, pero en el II se agruparon las cuatro cepas de origen ovino junto con cuatro de las cepas aisladas de pacientes, mostrando todas ellas el mismo patrón de genes *stxs* (*stx2c*). Dentro de este pulsotipo, dos cepas clínicas presentaban un 90,1% de similitud con las cepas de origen ovino. Esta similitud entre cepas de origen humano y cepas procedentes de rumiantes ha sido observada por otros autores (Mora et al., 2004) y confirma que estos animales pueden ser un reservorio de cepas de *E. coli* O157:H7.

La presencia de cepas de *E. coli* O157:H7 en muestras de heces de animales lecheros como es el ganado ovino es bastante frecuente (Blanco et al., 2003; Rey et al., 2003; Sánchez et al., 2009) pero, aunque la incidencia de los genes *stx1* y *stx2* en muestras de leche es alta, el aislamiento de cepas O157 de este alimento suele ser muy bajo (Farrokh et al., 2013). En este estudio, la presencia de una cepa de *E. coli* O157:H7 en el agua de bebida del ganado es motivo de preocupación, ya que se ha comprobado que en una explotación, el agua de bebida contaminada con *E. coli* O157:H7 puede ser un reservorio de esta bacteria y la causa de diseminación dentro del rebaño (LeJeune et al., 2001; Berry & Wells, 2010).

En resumen, las similitudes halladas entre las cepas de *E. coli* O157:H7 de origen ovino y algunas de origen humano, tanto en el perfil de bandas obtenido con la técnica PFGE como en el fagotipo, confirma que los animales de la especie ovina constituyen un reservorio de *E. coli* O157:H7 y que su leche y productos derivados no tratados térmicamente pueden suponer un riesgo en relación con esta bacteria.

3. CEPAS DE *E. coli* STEC NO-O157

Las cepas de *E. coli* pertenecientes al serogrupo O157 han sido estudiadas exhaustivamente pero se ha prestado mucha menos atención a las cepas STEC no-O157. De hecho, no parece posible definir de forma adecuada a este último grupo de bacterias ya que se han aislado cepas STEC no-O157 pertenecientes a cientos de serovariedades. Además, presentan diferencias notables tanto en el fenotipo como en su patogenicidad (Bettelheim, 2007). En nuestras cepas se han apreciado distintos fenotipos ya que, por ejemplo, unas fermentaban el sorbitol y otras no, sucediendo lo mismo con la capacidad de fermentar la lactosa. Tenían en común, la presencia de genes *stxs* y del gen que codifica para la enterohemolisina (*exhA*).

En cuanto a los genes que codifican para las toxinas Stxs (Figura II.9, Tablas II.11 y II.15), en todas las cepas, salvo una, se detectó el gen *stx1* sólo (80,7%) o acompañado del gen *stx2* (17,7%). La cepa restante (1,6%) poseía únicamente el gen *stx2*. Estos datos coinciden con los obtenidos en otros estudios realizados con poblaciones de STEC no-O157 de origen ovino en los que la mayor incidencia también correspondía a cepas *stx1+* y *stx1+/stx2+* (Blanco et al., 2003; Oporto et al., 2008). En nuestro caso, resulta evidente la diferencia entre las cepas de *E. coli* STEC no-O157 y las O157:H7 ya que estas últimas albergaban todas ellas el gen *stx2*. Considerando los subtipos de los genes *stxs*, el encontrado con mayor frecuencia entre las cepas no-O157 *stx1+* fue el *stx1c* y entre las cepas *stx2+*, únicamente se detectó el *stx2b*. Ambos subtipos han sido descritos frecuentemente en cepas STEC procedentes de pequeños rumiantes y también de ciervos (Beutin et al., 2007; Martin & Beutin, 2011). La importancia clínica de las cepas *stx2+* es superior tanto a la de las cepas *stx1+* como a la de las cepas *stx1+/stx2+* ya que la probabilidad de que las primeras puedan inducir la aparición del síndrome SUH es más alta. Además, como ya se ha indicado, los subtipos *stx2a*, *stx2c* y *stx2d* son los que parecen presentar un riesgo mayor como agentes de procesos clínicos graves (EFSA, 2007; Farrokh et al., 2013).

Las Figuras II.9 y II.10 junto con la Tabla II.15 muestran que todas las cepas de *E. coli* STEC no-O157, excepto una, eran portadoras del gen *exhA* (enterohemolisina). Este dato también coincide con otros procedentes de estudios previos en los que el

porcentaje de cepas STEC ovinas que presentaban este gen era elevado (Zschöck et al., 2000; Djordjevic et al., 2001; Djordjevic et al., 2004; Bhat et al., 2008; Vettorato et al., 2009).

El gen que codifica para la intimina (*eae*) se encontró en cuatro cepas que también presentaban los genes *stx1a* y *exhA*. Dos de ellas (M375aVO y M518VO) procedían de muestras de leche de tanque y las otras dos (C65VO y C180VO) de pacientes. Las dos cepas aisladas de leche formaban el pulsotipo V (Figura II.10). Una de las cepas clínicas (C180VO) no pertenecía a ningún “cluster” (Figura II.10) y presentaba el serotipo O98:H- mientras que la cuarta cepa (C65VO), también de origen humano, se agrupaba con cepas ovinas y otra clínica en el pulsotipo II (Figura II.10). La cepa C65VO pertenecía al serotipo O26:H11 (Tabla II.15) que produce procesos graves y brotes similares a los ocasionados por cepas del serogrupo O157 (Gyles, 2007). Las cepas del serotipo O26:H11 suelen ser, como en nuestro caso, portadoras del gen *stx1* pero cepas O26:H11 *stx1+*/*stx2+* o *stx2+* están empezando a ser implicadas en infecciones y SUH (EFSA, 2007). Teniendo en cuenta que el gen *eae* es considerado un posible marcador de virulencia (Farrokh et al., 2013) y que dos de las cepas *eae+* eran clínicas y mostraban idéntico perfil de genes que las aisladas de leche, podría ser que estas últimas (M375aVO y M518VO) fueran también potencialmente patógenas.

Considerando en su conjunto los genes de virulencia discutidos hasta ahora, el patrón dominante correspondía a los *stx1* (principalmente el subtipo *stx1c*) y *exhA*. Este perfil ha sido mayoritariamente hallado en cepas STEC procedentes de ovino aisladas y caracterizadas por algunos investigadores (Zschöck et al., 2000; Djordjevic et al., 2001; Zweifel et al., 2004) aunque en otras poblaciones de cepas ovinas, el perfil mayoritario de los genes encontrados estaba formado por *stx1*, *stx2* y *hlyA* (Rey et al., 2003; Vettorato et al., 2003; Djordjevic et al., 2004; Bhat et al., 2008; Vettorato et al., 2009).

La subtilasa (SubAB) es una citotoxina producida por algunas cepas de STEC que, generalmente, carecen de la isla de patogenicidad LEE. Se han descrito dos variantes de los genes *subAB*, la presente en el plásmido pO113 denominada *subAB₁* que aparece junto con el gen *saa* (codifica para una adhesina autoaglutinante) y la

localizada en una isla de patogenicidad (“SE-PAI”), junto con el gen *tia* (codifica para un factor de invasión descrito en ETEC), denominada *subAB*₂ (Michelacci et al., 2013). Entre nuestras cepas (Tabla II.12 y II.15), 25 (40,3%) poseían el gen *subAB*, 21 de ellas el gen *tia* y ninguna de las de este grupo el gen que codifica para la intimina (*eae*) que está presente en la isla de patogenicidad LEE. Diecisiete de las cepas *subAB*+ presentaban la variante alélica *SubAB*₂, 13 de ellas junto con el gen *tia*. Se ha sugerido que las cepas LEE- “SE-PAI”+ han surgido de una exclusión mutua de las islas de patogenicidad LEE y “SE-PAI” que podrían competir por el mismo lugar de integración. Esta hipótesis explicaría la presencia del operón *subAB*₂ en las cepas LEE- y su aparente ausencia en las LEE+ (Michelacci et al., 2013). Orden et al. (2011) investigaron el gen *subAB* y los genes *saa* y *tia* en cepas de *E. coli* STEC procedentes de pequeños rumiantes. Un 91,9% de las cepas resultaron positivas para el gen *SubAB* y la mayoría presentaron además el gen *tia*. En nuestro estudio, ocho de las cepas *subAB*+ no presentó ninguna de las dos variantes alélicas, lo que podría explicarse por la sugerencia previa de que, probablemente, existen más variantes alélicas de este gen (Michelacci et al., 2013).

En la cepa clínica C59VO (pulsotipo III, Figura II.10) que mostraba el perfil *stx2b+/ehxA+* y pertenecía al serotipo O146:H21 se detectaron también los genes *subAB*, *subAB*₂ y *tia* (Tabla II.15). Además de los factores de virulencia regulados por los genes *stxs*, *eae* y otros, la producción de la citotoxina SubAB podría contribuir a la patogenicidad de las cepas de *E. coli* STEC *eae*- (Orden et al., 2011).

Considerando la resistencia a los antimicrobianos ensayados, nueve cepas (14,5%), aisladas de muestras de leche de tanque y de heces de oveja procedentes de cinco explotaciones diferentes, mostraron resistencia a uno o más de los siguientes compuestos: estreptomicina (S), sulfamidas (S3), ampicilina (AMP), tetraciclina (TE), cefalotina (KF), cloranfenicol (C), amoxicilina–ácido clavulánico (AMC), cefoxitina (FOX) y cefaclor (CEC) (Tabla II. 13). Los antimicrobianos frente a los que se encontró mayor resistencia fueron la estreptomicina y las sulfamidas, seguidos de ampicilina, tetraciclina y cefalotina. En otros estudios realizados con cepas procedentes de diferentes especies animales, entre ellas ovino, se observó una resistencia elevada frente a tetraciclina, ampicilina y estreptomicina aunque también era significativa

frente a sulfamidas, cefalotina y cloranfenicol (Khan et al., 2002; Mora et al., 2005; Karczmarczyk et al., 2011).

El uso de antibióticos de un grupo puede producir resistencias a otros del mismo grupo/generación y a los de generaciones anteriores (siempre que posean el mismo mecanismo de acción), por lo que el patrón de resistencia detectado en estas cepas de origen ovino podría estar relacionado con los medicamentos veterinarios utilizados en sanidad animal para prevenir y/o tratar las mamitis y otras patologías. Durante el secado, se utilizan dos terapias para la prevención de las mamitis:

- Cefaxam (Laboratorios Syva S.A.U., León), 383 g de Cefapirina-benzatina. Éste producto incluye una cefalosporina de primera generación (cefapirna) y una penicilina (benzatina) que actúa inhibiendo la síntesis y reparación de la pared bacteriana.
- Mamyzin secado (Boehringer-Ingelheim España S.A., Barcelona), 100 mg de penetamato iohidrato, 280 mg de benetamina penicilina y 100 mg de framisetina sulfato. Este fármaco contiene por tanto penicilinas (penetamato iohidrato -que da lugar a la liberación de una bencilpenicilina- y benetamina penicilina) y un aminoglucósido (framisetina sulfato).

En el caso de mamitis clínica y agalaxia contagiosa (*Mycoplasma agalactiae*) se utilizan espiromicina (macrólido), enrofloxacin (quinolona) y penicilina. En época de paridera se suele emplear además doxiciclina (tetraciclina) para la prevención de abortos; y en caso de pedero se utiliza oxitetraciclina (tetraciclina).

Por tanto, el uso de estos y otros tratamientos podrían explicar la aparición de resistencias a antimicrobianos en nuestras cepas.

Entre nuestras cepas, se detectaron cinco resistentes a la estreptomicina que lo fueron también a las sulfamidas, ya que los genes que les conferían esta resistencia eran el *strA* y el *strB* (Tabla II.14) que, como ya se ha dicho, normalmente se encuentran precedidos por el gen *sul2* que confiere resistencia a las sulfamidas (Bean et al., 2009).

Una cepa de leche (M208VO) y dos de heces (F1VO y F6VO) eran resistentes a la estreptomocina, la tetraciclina y las sulfamidas. La causa de la resistencia a la estreptomocina y a las sulfamidas ya se ha discutido. En el caso de la tetraciclina la resistencia se debió a la presencia de “bombas de expulsión de tetraciclinas” (*tetA* o *tetB*) (Tabla II.14).

Dos cepas aisladas de leche (M279aVO y M279bVO) eran resistentes a la ampicilina, la estreptomocina y las sulfamidas. La causa de las dos últimas resistencias se ha comentado reiteradamente. El determinante de la resistencia a la ampicilina era el gen *TEM*, la secuenciación de este gen demostró la presencia de la β -lactamasa TEM-1b (Tabla II.14).

La cepa de leche M298VO mostraba resistencia a la ampicilina, la cefalotina y al cloranfenicol. La resistencia al cloranfenicol en las cepas M298VO y M299VO es llamativa ya que se trata de un medicamento que, en la Unión Europea, está incluido en la lista de sustancias prohibidas para uso veterinario desde el año 1990 y actualmente en el Reglamento UE 37/2010 (Anónimo, 2010). Nuestros datos (Tabla II.14) sugieren que las resistencias de las cepas M298VO, M299VO y M329VO podrían deberse a alteraciones en la membrana celular. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas es una barrera frente a moléculas polares. Las porinas, que facilitan el paso de pequeños nutrientes polares, son la principal vía de entrada de muchos antibióticos (β -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas y cefalosporinas) (Harder et al., 1981; Nikaido, 2003; Tenover, 2006; Lou et al., 2011). La resistencia a antimicrobianos ha sido relacionada con la alteración de la expresión de porinas o su función restringida debido a mutaciones puntuales. *E. coli* produce principalmente dos porinas (OmpC y OmpF) que se expresan en ambientes con alta osmolaridad como el intestino humano. Muchas cepas de *E. coli* resistentes han disminuido o eliminado la expresión de la OmpF lo que evidencia que esta porina es la principal vía de entrada de antibióticos. Más recientemente se ha sugerido que el papel de la OmpC en la resistencia a antibióticos podría estar subestimado, ya que mutaciones en esta porina han sido detectadas en cepas resistentes (Harder et al., 1981; Nikaido, 2003; Pagès et al., 2008; Lou et al., 2011).

Finalmente, una cepa aislada de heces ovinas, la F3VO, era resistente a cinco antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalotina, cefoxitina y cefaclor. La resistencia de la cepa F3VO a todos estos compuestos estaría relacionada con la presencia de la β -lactamasa AmpC cromosómica inducible (Tabla II.14) que explicaría la resistencia a aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación, cefamicinas (cefoxitina, cefotetán) y aminopenicilinas combinadas con inhibidores de β -lactamasas como amoxicilina-ácido clavulánico (Del Valle Martínez, 2011).

Con los datos obtenidos en este trabajo, se puede concluir que la incidencia de resistencia a antimicrobianos entre las cepas no-O157 era inferior a la observada entre las cepas O157. Esto no coincide con estudios previos, que observaron que el porcentaje de cepas no-O157 resistentes era superior al de las cepas O157. Sin embargo, sí que coincide con el hecho de que los perfiles de resistencia correspondían mayoritariamente a determinados compuestos como estreptomina y sulfamidas (Tablas II.9 y II.13) (Meng et al., 2013). La presencia y diseminación de cepas STEC resistentes o multirresistentes en alimentos es preocupante.

Por lo que respecta al genotipado de la población no-O157, el análisis del dendrograma presentado en la Figura II. 10, muestra que, utilizando la técnica PFGE, la mayoría de las cepas de leche de tanque (35 de 47) y de las obtenidas de heces de oveja (siete de 10) se agruparon en el “cluster” I. Todas ellas presentaban el genotipo *stx1c+/ehxA+* y 13 eran, además, *subAB+*. Este pulsotipo contenía subgrupos con cepas idénticas o muy semejantes que, a veces, procedían de la misma explotación (con distinto fenotipo) pero también de diferentes rebaños. Esto último podría explicarse por el posible intercambio de ganado entre las diferentes explotaciones que integran el Consorcio.

El “cluster” II estaba formado por cepas de todos los orígenes, salvo de agua de bebida, destacando la presencia de dos de las cepas clínicas. Una de ellas, la cepa C74VO mostraba una similitud superior al 95% con otra obtenida de heces de oveja (F10VO), siendo ambas *stx1c+/ehxA+*. El “cluster” III también contenía otra cepa clínica (C59VO) que mostraba una similitud del 80,6% con dos cepas de leche (M279aVO y M279bVO). La cepa humana C59VO era *stx2b+/exhA+/subAB+/tia+/subAB₂* y las de

leche *stx1c+*/*stx2b+*/*exhA+*/*subAB+*/*tia+*/*subAB₂*. La cepa clínica restante (C180VO) era *stx1a+*/*eae+*/*ehxA+* y no se agrupó en ningún “cluster”.

El “cluster” IV incluía cepas de leche y una de agua de bebida. Todas ellas poseían el gen *stx1c*. La presencia de una cepa de *E. coli* STEC no-O157 en el agua de bebida de una explotación supone, como en el caso de la cepa O157:H7, un riesgo por su posible diseminación en el rebaño. El quinto “cluster” estaba constituido sólo por dos cepas de leche con el mismo genotipo *stx1a+*/*eae+*/*ehxA+*.

En cuanto al origen de la contaminación de la leche, se han propuesto dos posibilidades; una, poco frecuente, serían las mamitis subclínicas por cepas STEC y la otra, más probable, la contaminación con heces tanto directa como indirectamente. Se considera que un número considerable de animales lecheros albergan cepas STEC en su intestino. Las heces de estos animales contaminarían la ubre y de ahí pasarían a la leche durante el ordeño. Además, estas cepas podrían permanecer viables en las ordeñadoras y en otros equipos y utensilios de la explotación si éstos no están bien diseñados y no se limpian y desinfectan correctamente. Por lo tanto, el mantenimiento de animales limpios y la higiene adecuada durante el ordeño son factores clave para minimizar la presencia de cepas STEC en la leche durante la producción primaria. Para ganado vacuno y cepas O157:H7 se han propuesto medidas adicionales como son la detección de animales portadores, el empleo de probióticos, la utilización de vacunas, etc. (Farrokh et al., 2013).

En resumen, la leche de oveja, las heces de estos animales y el agua de bebida contienen frecuentemente cepas de *E. coli* STEC no-O157, siendo algunas de ellas semejantes a las obtenidas de coprocultivos de pacientes.

La conclusión general del trabajo recogido en este Capítulo es la siguiente: en la leche de oveja y en el medio ambiente de las explotaciones ovinas se detectan frecuentemente cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga. Como era de esperar, la incidencia de cepas O157:H7 es menor que la de las cepas no-O157. Sin embargo, todas poseían genes marcadores de virulencia, siendo algunas de ellas resistentes a uno o varios agentes antimicrobianos. La comparación, mediante PFGE, de ambos grupos con cepas clínicas detectó similitudes. Nuestros datos confirman que la leche

Capítulo II. Discusión

de oveja y la propia explotación, especialmente el agua de bebida, son un reservorio de estas bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anónimo. 2010. Reglamento (UE) Nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. D. O., L 15: 1-72.
2. Bean, D. C., Livermore, D. M. and Hall, L. M. C. 2009. Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. Antimicrob. Agents Chemother., 53: 1088-1093.
3. Bergan, J., Dyve Lingelem, A. B., Simm, R., Skotland, T. and Sandvig, K. 2012. Shiga toxins. Toxicon, 60: 1085-1107.
4. 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. Adv. Food Nutr. Res., 60: 67-117.
5. Bettelheim, K. A. 2007. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. Crit. Rev. Microbiol., 33: 67-87.
6. Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K. and Albrecht, N. 2007. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. Appl. Environ. Microbiol., 73: 4769-4775.

7. Bhat, M. A., Nishikawa, Y. and Wani, S. A. 2008. Prevalence and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrhoeic and healthy lambs in India. *Small Ruminant Res.*, 75: 65-70.
8. Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Dahbi, G. and González, E. A. 2003. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1351-1356.
9. Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A. and Fach, P. 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int. J. Food Microbiol.*, 142: 318-329.
10. Caro, I., Fernández-Barata, V. M., Alonso-Llamazares, A. and García-Armesto, M. R. 2006. Detection, occurrence, and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from raw ewe's milk in Spain. *J. Food Prot.*, 69: 920-924.
11. Chapman, P. A., Cerdan Malo, A. T., Ellin, M., Ashton, R. and Harkin, M. A. 2001. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int. J. Food Microbiol.*, 64: 139-150.
12. Chu, C., Chiu, C. H., Wu, W. Y., Chu, C. H., Liu, T. P. and Ou, J. T. 2001. Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 2299-2303.

13. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement, 25 n°1 M100-S15.
14. Del Valle Martínez, D. 2011. Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 29: 78-83.
15. Desmarchelier, P. M., Bilge, S. S., Fegan, N., Mills, L., Vary Jr, J. C. and Tarr, P. I. 1998. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the rfb locus encoding O157 lipopolysaccharide. J. Clin. Microbiol., 36: 1801-1804.
16. Djordjevic, S. P., Ramachandran, V., Bettelheim, K. A., Vanselow, B. A., Holst, P., Bailey, G. and Hornitzky, M. A. 2004. Serotypes and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep. Appl. Environ. Microbiol., 70: 3910-3917.
17. Djordjevic, S. P., Hornitzky, M. A., Bailey, G., Gill, P., Vanselow, B., Walker, K. and Bettelheim, K. A. 2001. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. J. Clin. Microbiol., 39: 2017-2021.
18. EFSA. 2011. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. EFSA Journal, 9: 2390.
19. EFSA. 2007. Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. EFSA Journal, 579: 1-61.

20. Elizaquível, P., Sánchez, G. and Aznar, R. 2011. *Escherichia*. In: Liu, D. (Ed.), Molecular detection of human bacterial pathogens. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 869-879.
21. EUCAST. 2012a. Método de difusión con discos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Disponible en: <http://coesant-seimc.org/documents/Método%20de%20difusión%20con%20discos.pdf>. Última visita 24 de Marzo de 2014.
22. EUCAST. 2012b. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. <http://www.eucast.org>. Última visita 24 de Marzo de 2014.
23. Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condrón, R., De Reu, K. and Govaris, A. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.*, 162 (2): 190-212.
24. Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M. and Deng, M. Y. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2188-2191.
25. Gannon, V. P. I., Rashed, M., King, R. K. and Thomas, E. J. G. 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 1268-1274.
26. Gannon, V. P. I., D'Souza, S., Graham, T., King, R. K., Rahn, K. and Read, S. 1997. Use of the flagellar H7 Gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in

identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. J. Clin. Microbiol., 35: 656-662.

27. González-Sanz, R., Herrera-León, S., De La Fuente, M., Arroyo, M. and Echeita, M. A. 2009. Emergence of extended-spectrum β -lactamases and AmpC-type β -lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. J. Antimicrob. Chemother., 64: 1181-1186.

28. Griggs, D. J., Gensberg, K. and Piddock, L. 1996. Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. Antimicrob. Agents Chemother., 40: 1009-1013.

29. Guerra, B., Soto, S. M., Argüelles, J. M. and Mendoza, M. C. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4, 5, 12: i:-]. Antimicrob. Agents Chemother., 45: 1305-1308.

30. Guerra, B., Junker, E., Miko, A., Helmuth, R. and Mendoza, M. 2004. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. Microbial Drug Resistance, 10: 83-91.

31. Gyles, C. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J. Anim. Sci., 85: E45-E62.

Capítulo II. Bibliografía

32. Harder, K. J., Nikaido, H. and Matsushashi, M. 1981. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 20: 549-552.
33. Heuvelink, A. E., Van Den Biggelaar, F. L. A. M., De Boer, E., Herbes, R. G., Melchers, W. J. G., Huis, J. H. J. and Monnens, L. A. H. 1998. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 878-882.
34. Karczmarczyk, M., Abbott, Y., Walsh, C., Leonard, N. and Fanning, S. 2011. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from animals presenting at a university veterinary hospital. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 7104-7112.
35. Khakhria, R., Duck, D. and Lior, H. 1990. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.*, 105: 511-520.
36. Khan, A., Das, S. C., Ramamurthy, T., Sikdar, A., Khanam, J., Yamasaki, S., Takeda, Y. and Nair, G. B. 2002. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 2009-2015.
37. LeJeune, J. T., Besser, T. E. and Hancock, D. D. 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3053-3057.
38. Levesque, C., Piche, L., Larose, C. and Roy, P. H. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 185-191.

39. Lin, A., Sultan, O., Lau, H. K., Wong, E., Hartman, G. and Lauzon, C. R. 2011. O serogroup specific real time PCR assays for the detection and identification of nine clinically relevant non-O157 STECs. *Food Microbiol.*, 28: 478-483.
40. Liu, Y., DebRoy, C. and Fratamico, P. 2007. Sequencing and analysis of the *Escherichia coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences. *Mol. Cell. Probes*, 21: 295-302.
41. Lou, H., Chen, M., Black, S. S., Bushell, S. R., Ceccarelli, M., Mach, T., Beis, K., Low, A. S., Bamford, V. A. and Booth, I. R. 2011. Altered antibiotic transport in OmpC mutants isolated from a series of clinical strains of multi-drug resistant *E. coli*. *PloS one*, 6: e25825.
42. Machado, J., Grimont, F. and Grimont, P. A. D. 2000. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Res. Microbiol.*, 151: 535-546.
43. Madsen, L., Aarestrup, F. M. and Olsen, J. E. 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. *Vet. Microbiol.*, 75: 73-82.
44. 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.

45. Meng, J., Jeffrey, T. L., Zhao, T. and Doyle, M. P. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Doyle, M. P. and Buchanan, R. L. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA, pp. 287-309.
46. Michelacci, V., Tozzoli, R., Caprioli, A., Martínez, R., Scheutz, F., Grande, L., Sánchez, S. and Morabito, S. 2013. A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin. Clin. Microbiol. and Infect., .
47. Monday, S., Beisaw, A. and Feng, P. 2007. Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. Mol. Cell. Probes, 21: 308-311.
48. Mora, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Dhabi, G., Echeita, A., González, E. A., Bernárdez, M. I. and Blanco, J. 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. Res. Microbiol., 156: 793-806.
49. Mora, A., Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Dhabi, G., Thomson-Carter, F., Usera, M. A., Bartolomé, R., Prats, G. and Blanco, J. 2004. Phage types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). J. Clin. Microbiol., 42: 4007-4015.
50. Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M. and Mulvey, M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. Mol. Cell. Probes, 15: 209-215.

51. Ng, L. K., Mulvey, M. R., Martin, I., Peters, G. A. and Johnson, W. 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 3018-3021.
52. Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 593-656.
53. Olsen, J. E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P. E., Popovic, T., Rasmussen, H. N. and Olsvik, O. 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, 28: 1-78.
54. Oporto, B., Esteban, J. I., Aduriz, G., Juste, R. A. and Hurtado, A. 2008. *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in northern Spain. *Zoonoses and public health*, 55: 73-81.
55. Orden, J. A., Horcajo, P., de la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Domínguez-Bernal, G. and Carrión, J. 2011. Subtilase cytotoxin-coding genes in verotoxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and goats differ from those from cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 8259-8264.
56. Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marchès, O. and Caprioli, A. 2000. Typing of intimin genes in human and animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*, 68: 64-71.
57. Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M. M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E. and Rossolini, G. M. 2003. Multiple CTX-M-type extended-

spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. J. Clin. Microbiol., 41: 4264-4269.

58. Pagès, J., James, C. E. and Winterhalter, M. 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat. Rev. Microbiol., 6: 893-903.

59. Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H. and Paton, J. C. 2004. A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxicogenic *Escherichia coli*. J. Exp. Med., 200: 35-46.

60. Paton, A. W. & Paton, J. C. 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. J. Clin. Microbiol., 40: 271-274.

61. Paton, J. C. & Paton, A. W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev., 11: 450-479.

62. Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. and Fach, P. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157: H7, associated with the world's most frequent clinical cases. Mol. Cell. Probes, 18: 185-192.

63. Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D. and 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.

Capítulo II. Bibliografía

64. Randall, L., Cooles, S., Osborn, M., Piddock, L. and Woodward, M. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53: 208-216.
65. Rey, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Usera, M. A., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I. and Blanco, J. 2003. Serotypes, phage types and virulence genes of shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Vet. Microbiol.*, 94: 47-56.
66. Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Dahbi, G., Lopez, C., Mora, A., Rey, J. and Alonso, J. M. 2009. Longitudinal study of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding in sheep feces: persistence of specific clones in sheep flocks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 1769-1773.
67. Sandvang, D., Aarestrup, F. M. and Jensen, L. B. 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.*, 160: 37-41.
68. 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. and 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.
69. Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.*, 119: S3-S10.

Capítulo II. Bibliografía

70. Tozzoli, R., Caprioli, A., Cappannella, S., Michelacci, V., Marziano, M. L. and Morabito, S. 2010. Production of the subtilase AB5 cytotoxin by Shiga toxin-negative *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 48: 178-183.
71. Vettorato, M. P., Leomil, L., Guth, B. E. C., Irino, K. and Pestana de Castro, A. F. 2003. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of São Paulo, Brazil. Vet. Microbiol., 95: 103-109.
72. Vettorato, M., De Castro, A., Cergole-Novella, M., Camargo, F., Irino, K. and Guth, B. 2009. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy sheep of different populations in São Paulo, Brazil. Lett. Appl. Microbiol., 49: 53-59.
73. Wang, G., Clark, C. G. and 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.
74. Yan, J. J., Ko, W. C., Jung, Y. C., Chuang, C. L. and Wu, J. J. 2002. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 β -lactamase in a university hospital in Taiwan. J. Clin. Microbiol., 40: 3121-3126.
75. Yoo, M. H., Huh, M., Kim, E., Lee, H. and Jeong, H. D. 2003. Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments. Aquaculture, 217: 11-21.

76. Zschöck, M., Hamann, H. P. and Wolter, W. 2000. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. Lett. Appl. Microbiol., 31: 203-208.

77. Zweifel, C., Zychowska, M. A. and Stephan, R. 2004. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. Int. J. Food Microbiol., 92: 45-53.



CAPÍTULO III: Caracterización y estudio comparativo de cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) procedentes de leche de oveja, muestras ambientales y de pacientes

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli enteropatogénico (EPEC) es un importante agente de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, siendo responsable de índices de mortalidad elevados (30%) (Chen & Frankel, 2005). Algunos serotipos pertenecientes a cepas de EPEC típicas (tEPEC) se encuentran asociados principalmente a diarreas en niños menores de un año, mientras que en niños mayores de un año la frecuencia es mucho menor. En personas adultas, las infecciones por estos serotipos son muy raras. El aumento de la resistencia en niños mayores y en adultos puede estar asociado al desarrollo de inmunidad o a la pérdida de receptores para determinadas adhesinas. En el caso de cepas de EPEC atípicas (aEPEC), algunos trabajos publicados demuestran tanto su implicación como agentes productores de diarreas en todos los grupos de edad como su carácter emergente en países desarrollados (Trabulsi et al., 2002; Hernandez et al., 2009).

En animales no se suelen aislar cepas de tEPEC, lo que sugiere que el hombre es el único reservorio de estos microorganismos. Por otro lado, se han publicado estudios en los que se han aislado cepas de aEPEC procedentes de muestras humanas y de animales sanos y enfermos de diferentes especies. Entre éstos, muchos pertenecían a especies destinadas a la producción de alimentos como ungulados domésticos y aves de corral, aunque también se han detectado cepas de aEPEC en animales de compañía (perros y gatos), venados y simios (Trabulsi et al., 2002; Hernandez et al., 2009). Aunque no existe evidencia de la transmisión directa animal-hombre, algunas cepas de aEPEC aisladas de animales pertenecen a serogrupos asociados a enfermedad en humanos como son: O26, O103, O119, O128 y O142, lo que sugiere que los animales pueden ser un importante reservorio de aEPEC, pudiendo, por tanto, constituir, los animales de abasto y los alimentos derivados de ellos, una fuente de transmisión para el hombre (Hernandez et al., 2009). Asimismo, la leche y los productos lácteos aparecen frecuentemente contaminados con cepas de aEPEC (Silva et al., 2001; Holko et al., 2006; García Díez et al., 2009). Por tanto, teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se podría asumir un posible acceso de estas cepas al hombre vía los alimentos de origen animal como puede ser la leche de oveja y el más importante de sus productos derivados en España; los quesos elaborado con leche cruda.

OBJETIVO

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo ha sido determinar la presencia de cepas de aEPEC en leche de oveja y en el ambiente de la explotación así como comparar filogenéticamente las cepas obtenidas de estos hábitats con otras aisladas de coprocultivos humanos, siendo el fin último intentar identificar posibles rutas de transmisión.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. AISLAMIENTO DE CEPAS EPEC A PARTIR DE COPROCULTIVOS HUMANOS

Durante los meses de Marzo a Mayo del año 2011 se recibieron muestras de coprocultivos procedentes de pacientes afectados de diarrea (Hospital de León). Estas muestras consistían en:

- Placas con colonias obtenidas por siembra directa de heces en Columbia Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) con 5% de sangre ovina.
- Placas con colonias obtenidas por siembra directa de heces en CT-SMAC (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

En nuestro laboratorio, se tomó un número representativo de colonias de cada una de las placas que se sometieron a un enriquecimiento no selectivo en Nutrient Broth (NB, Oxoid) con extracto de levadura (YE) (Oxoid, Basingstoke, UK) al 0,6% durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se procedió a sembrar los enriquecimientos en el medio selectivo y diferencial CT-SMAC (Oxoid) y, mediante PCR, se investigó en los caldos, la presencia de los genes que codifican para las toxinas Shiga (*stxs*) y la intimina (*eae*), utilizando las condiciones descritas anteriormente (apartado 5 del Material y Métodos del capítulo I). Finalmente se analizaron mediante PCR las colonias obtenidas de los enriquecimientos positivos. Las cepas *stx*- y *eae*+ se guardaron a -40 °C en NB (Oxoid) con glicerol (40%) (Acofarma, Barcelona, España) para caracterizarlas posteriormente.

2. CEPAS OBJETO DEL ESTUDIO

Se caracterizaron cepas sospechosas procedentes de muestras de leche de tanque, muestreos de explotaciones (véase Capítulo I) y las obtenidas de muestras clínicas.

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS EPEC

3.1. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas de leche de tanque

Los aislados obtenidos de la leche de ovino se caracterizaron fenotípicamente utilizando el sistema miniaturizado Api® 20E (BioMérieux) diseñado para la identificación de especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos. Incluye 20 pruebas bioquímicas que se analizan mediante una base de datos (<http://apiweb.biomerieux.com>).

3.2. Detección de genes mediante PCR

En las presuntas cepas de EPEC se investigó, mediante PCR, la presencia de los genes que se citan a continuación:

- Genes que codifican para las toxinas Shiga *stx1* (Pollard et al., 1990) y *stx2* (Olsen et al., 1995).
- El gen que codifica para la intimina (*eae*) (Oswald et al., 2000).
- El plásmido de adherencia EPEC (pEAF) (Franke et al., 1994).
- El gen que codifica para la adhesina BFP (*bfpA*) (Gunzburg et al., 1995).

En la Tabla III.1 se presentan los genes y las secuencias de los cebadores utilizados para la detección de cepas EPEC.

Tabla III.1. Genes objeto del estudio, secuencias de los cebadores utilizados e información relativa a la técnica de PCR empleada para la detección de cepas EPEC.

Diana	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb ^a)	Referencia	Condiciones PCR ^b
stx1	VT1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	(Pollard et al., 1990)	A
	VT1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA			
stx2	SLTII1	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	448	(Olsen et al., 1995)	A
	SLTII2	GGATGCATCTCTGGTCATTG			
eae	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881	(Oswald et al., 2000)	A
	SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTTCG			
pEAF	EAF1	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	397	(Franke et al., 1994)	B
	EAF25	TATGGGGACCATGTATTATCA			
bfpA	EP1	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	326	(Gunzburg et al., 1995)	A
	EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			

^apares de bases

^bcondiciones de PCR de acuerdo a la Figura III.1

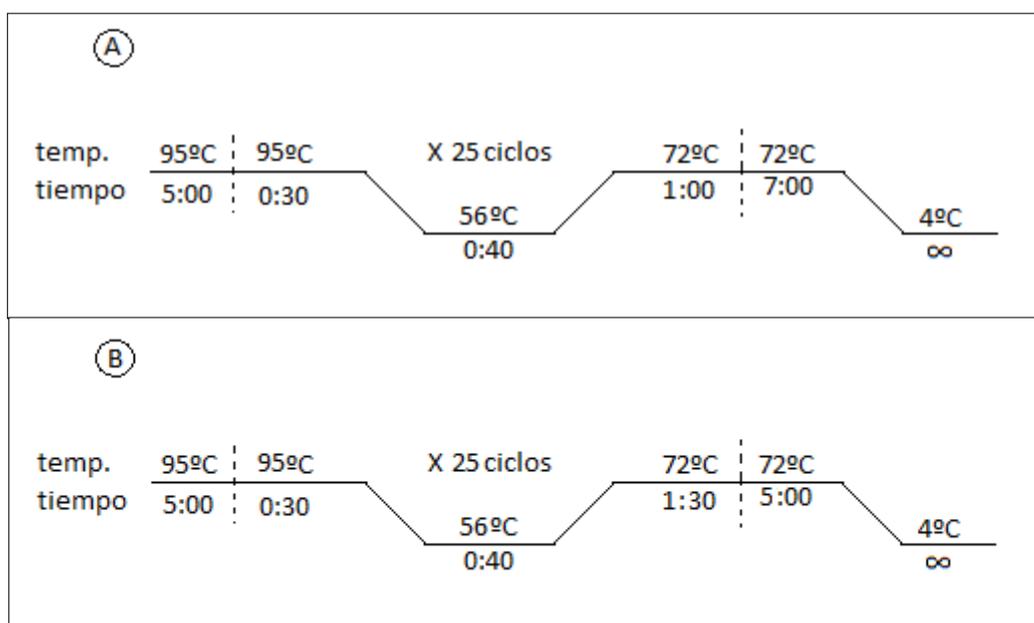


Figura III.1. Condiciones de las técnicas PCR utilizadas en la detección de cepas EPEC.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems 2720 (Life Technologies S.A., Applied Biosystems división, Madrid, España). Finalmente el producto de PCR fue resuelto mediante electroforesis en un gel de agarosa (Pronadisa, Chemie Brunschwig, Basel, Suiza) al 1,5% en Tris-Acetic Acid-EDTA (TAE, Laboratorios Conda) y posteriormente para su revelado se sumergió en una

solución con 10 mg/ml de Bromuro de etidio (AppliChem, Darmstadt, Alemania). Se observaron los resultados exponiendo el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y se realizó la captura de la imagen mediante el equipo Molecular Imager GelDoc XR System (Bio-Rad Laboratories).

3.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Se llevó a cabo la amplificación, purificación y secuenciación de siete genes “housekeeping” (*arcA*, *cyaA*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mtlD*, *rpoS*). Se seleccionaron estos genes (Tabla III.2) debido a que en estudios anteriores se vio que eran los que presentaban una mayor variabilidad (Moura et al., 2009). El protocolo seguido, junto con los cebadores utilizados fue el propuesto en la web *EcMLST* (<http://www.shigatox.net/new/tools/ecmlst.html>). La Figura III.2 informa de las condiciones de la técnica de PCR utilizada para la amplificación de los genes “housekeeping” del MLST.

Tabla III.2. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes “housekeeping” del MLST.

Diana	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb) ^a	Referencia
<i>arcA</i>	arcA-F1	GACAGATGGCGCGGAAATGC	552	http://www.shigatox.net/new/tools/ecmlst.html
	arcA-R2	TCCGGCGTAGATTCGAAATG		
<i>cyaA</i>	cyaA-F3	CTCGTCCGTAGGGCAAAGTT	571	
	cyaA-R3	AATCTCGCCGTCGTGCAAAC		
<i>fadD</i>	fadD-F6	GCTGCCGCTGTATCACATTT	580	
	fadD-R3	GCGCAGGAATCCTTCTTCAT		
<i>icdA</i>	icd-F2	CTGCGCCAGGAACTGGATCT	669	
	icd-R2	ACCGTGGGTGGCTTCAAACA		
<i>lysP</i>	lysP-F1	CTTACGCCGTGAATTAAGG	628	
	lysP-R8	GGTCCCTGGAAAGAGAAGC		
<i>mtlD</i>	mtlD-F2	GCAGGTAATATCGGTCGTGG	658	
	mtlD-R3	CGAGGTACGCGGTTATAGCAT		
<i>rpoS</i>	rpoS-F3	CGCCGGATGATCGAGAGTAA	618	
	rpoS-R1	GAGCCAATTCACGACCTA		

^apb: Pares de bases

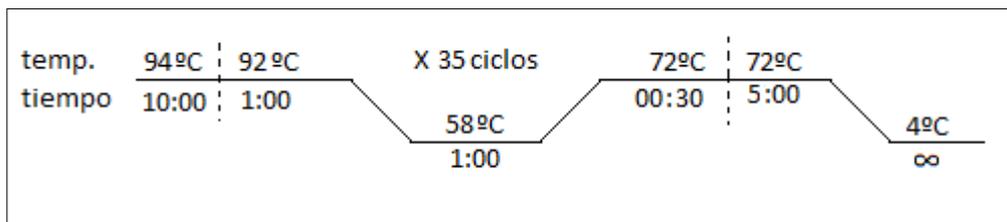


Figura III.2. Condiciones de PCR para la amplificación de los genes “housekeeping” del MLST.

Una vez realizada la PCR, los productos obtenidos fueron purificados con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León. Se utilizó el secuenciador Megabace 500 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y editadas mediante el uso del software Chromas Lite 2.1 (<http://technelysium.com.au/>). A cada uno de los *loci* de los diferentes genes se le asignó un número de alelo comparando estas secuencias con las correspondientes a los *loci* de los genes que aparecen en la base de datos de la web EcMLST (<http://www.shigatox.net/new/tools/ecmlst.html>) empleando la utilidad MegAlign (algoritmo ClustalW) del software Lasergene Core Suite versión 7.0.0 (DNASTAR) para la comparación. A cada cepa se le asignó un número arbitrario de “sequence type” (ST) en función del perfil de alelos que presentaba. 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) versión 0.9.0 beta. Finalmente se construyeron secuencias concatenadas a partir de las secuencias individuales de los diferentes genes de una cepa representativa de cada uno de los ST. Se alinearon estas secuencias y se construyó el árbol filogenético correspondiente utilizando el método Neighbor-Joining (NJ) estimando las distancias con el modelo de parámetro-2 de Kimura y un “bootstrap” de 1000 repeticiones utilizando el software MEGA5 (Tamura et al., 2011).

3.3. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

El protocolo utilizado se corresponde con el descrito en el punto 2.2.4 del Material y métodos del Capítulo II.

RESULTADOS

1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS EPEC

Se obtuvieron un total de 81 presuntas cepas de EPEC: 62 (76,5%) de leche de tanque, 10 (12,4%) de explotaciones y 9 (11,1%) de pacientes. Todas ellas presentaban el gen que codifica para la intimina (*eae*) y carecían de los genes que codifican para las toxinas Stxs (*stx1* y *stx2*). Tampoco se detectó el plásmido de adherencia EPEC (pEAF) ni la adhesina BFP (*bfpA*). Por tanto, se consideraron aEPEC.

Para las 62 cepas aisladas de leche de tanque, la caracterización fenotípica con el sistema miniaturizado Api® 20E dio los siguientes resultados: 43 (69,4%) fueron identificadas como *Escherichia coli*, 5 (8,1%) como *Hafnia alvei*, 4 (6,5%) como *Enterobacteriaceae*, 3 (4,8%) como *Raoultella ornithinolytica*, 2 (3,2%) como *Chronobacterium violaceum*, 1 (1,6%) como *Salmonella spp.*, 1 (1,6%) como *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii*, 1 (1,6%) como *Serratia odorífera*, 1 (1,6%) como *Acinetobacterium baumannii* y 1 (1,6%) como *Providencia rettgeri*.

2. TIPIFICACIÓN POR MLST

Se secuenciaron siete genes “housekeeping” de las 81 cepas EPEC obteniendo 19 perfiles de alelos o sequence types (STs) diferentes (Tabla III.3). Diez de las secuencias obtenidas en cinco de estos genes no se correspondían con ninguno de los alelos descritos hasta el momento, y fueron registradas como nuevos alelos en la base de datos de la web EcMLST (<http://www.shigatox.net/new/tools/ecmlst.html>). Los dos genes que presentaron una mayor variabilidad fueron el *icdA* y el *mtlD* con 12 alelos diferentes cada uno de ellos. El ST más frecuente fue el ST 14 con 41 aislados en total.

En un mismo ST se incluían cepas del mismo origen (ovino o humano), aunque en tres de los STs aparecen cepas de origen ovino y cepas aisladas de pacientes del Hospital de León. Estos tres perfiles alélicos son: el ST 14, con 37 de las cepas aisladas de leche de tanque y 4 cepas procedentes de pacientes; el ST 16 que incluía 1 cepa aislada de leche de tanque y 2 cepas procedentes de pacientes; y el ST 17 que incluía 2 cepas aisladas a partir de heces de ovino y 1 procedente de un paciente.

Tabla III.3. Perfil de alelos, frecuencia y origen de los STs obtenidos en la tipificación por MLST de 87 cepas de EPEC.

ST	Alelos de los genes "housekeeping"							Frecuencia (nº de cepas)	Origen de los aislados
	<i>arcA</i>	<i>cyaA</i>	<i>fadD</i>	<i>icdA</i>	<i>lysP</i>	<i>mtlD</i>	<i>rpoS</i>		
1	2	36 ^a	115	8	17	45 ^a	71 ^a	1	Clínica
2	3	2	13	4	1	13	1	1	Leche
3	3	3	2	2	1	3	1	1	Clínica
4	3	3	2	2	1	4	1	6	Leche y agua
5	3	3	13	4	1	13	1	1	Leche
6	3	3	13	39	1	13	17	1	Heces
7	3	3	13	203 ^a	1	13	69 ^a	2	Leche y agua
8	3	3	20	23	1	31	1	8	Leche
9	3	3	20	23	1	31	70 ^a	1	Agua
10	3	3	49	4	1	13	1	1	Leche
11	3	11	13	39	1	43 ^a	1	3	Leche y agua
12	6	1	4	3	2	11	8	1	Leche
13	7	26	13	54	35	34	46	1	Leche
14	8	2	1	15	1	2	1	41	Leche y clínica
15	8	3	2	4	1	13	1	4	Leche, heces y aire
16	9	2	1	1	1	41	1	3	Leche y clínica
17	9	3	2	4	1	13	1	3	Heces y clínica
18	24	32	6	75	4	42	26	1	Leche
19	27 ^a	35 ^a	110	136	78	44 ^a	17	1	Agua

^aNuevos alelos registrados en la base de datos de la página web *EcMLST*

Del análisis mediante MLST se obtuvieron tres grupos clonales utilizando el algoritmo eBursts (Figura III.3). En uno de estos grupos clonales se incluían un total de siete STs (2, 5, 6, 7, 10, 15 y 17), siendo identificado el ST 5 como el ST de origen. Como muestra la Figura III.3, el ST de origen aparece en el círculo central, en el siguiente círculo concéntrico se sitúan los STs con una variación en un *locus* ("single-locus variants" - SLVs) y, finalmente, en el círculo externo aparecen los STs que poseen variación en dos *loci* ("double-locus variants" - DLVs).

Además de este gran grupo clonal, se obtuvieron otros dos grupos clonales constituidos cada uno de ellos por dos STs diferenciados entre sí por una variación en un *locus*. En el primero de ellos se incluyen los STs 3 y 4, mientras que en el segundo se incluyen los STs 8 y 9. Los ocho STs restantes (1, 11, 12, 13, 14, 16, 18 y 19) no fueron incluidos en ningún grupo clonal ("singletons").

Las distancias relativas entre los diferentes STs también fueron representadas en una red filogenética mediante el algoritmo eBursts (Figura III.4).

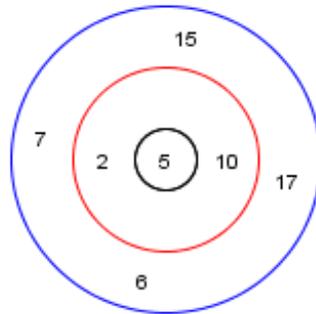


Figura III.3. Representación gráfica de las relaciones entre STs de uno de los grupos clonales obtenidos mediante el uso del algoritmo eBursts.

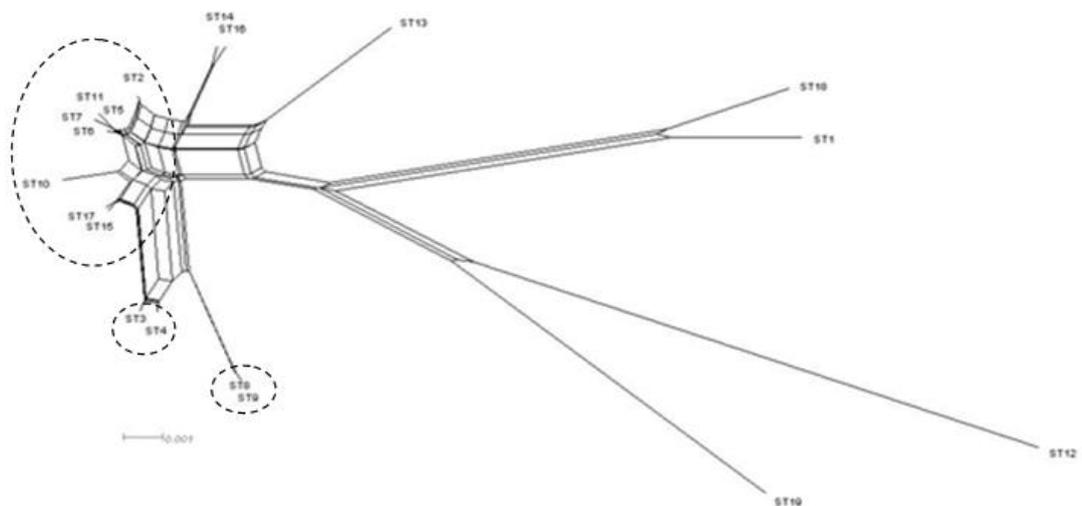


Figura III.4. Representación gráfica de la red filogenética obtenida mediante el método “split decomposition” (algoritmo eBursts). Se identifican los grupos clonales con un círculo.

Finalmente, con las secuencias concatenadas se construyó el árbol filogenético representado en la Figura III.5, que muestra una agrupación similar a la obtenida en la red filogenética con elevados valores *bootstrapping*.

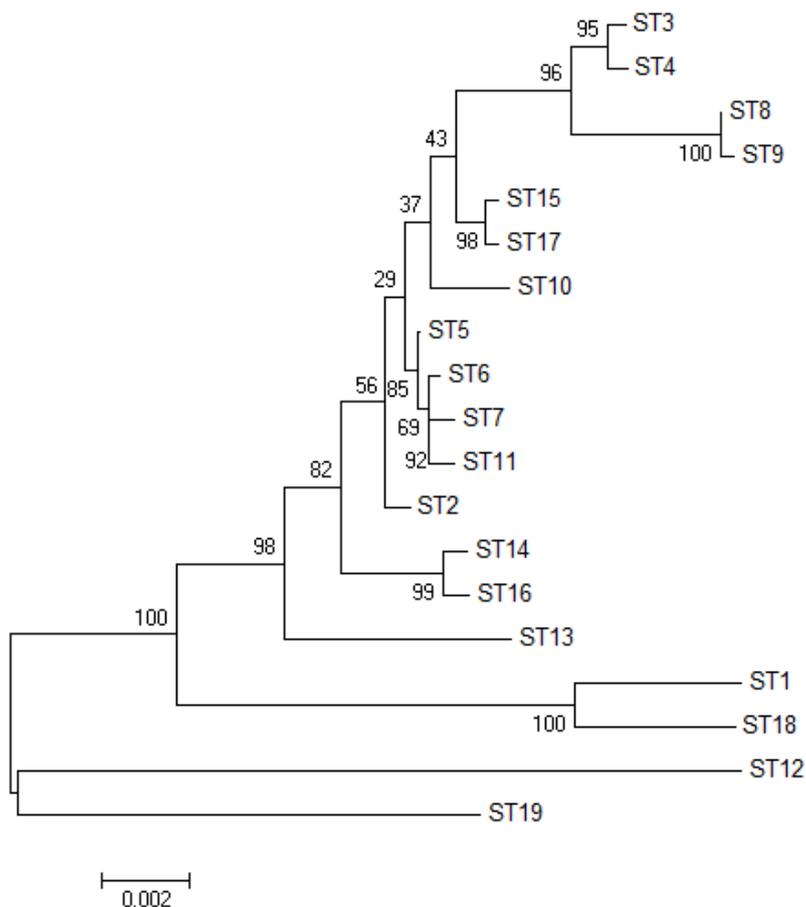


Figura III.5. Árbol filogenético de los perfiles de alelos (STs) de cepas aEPEC obtenidas mediante el método Neighbor-Joining. En los nodos de las ramas se presentan los valores *bootstrapping*.

3. TIPIFICACIÓN POR PFGE

El genotipado de las 81 cepas mediante PFGE dio lugar a 57 patrones de bandas diferentes divididos en 24 grupos (pulsotipos) con un valor de similitud de al menos el 74,5% (Figura III. 6). Algunas cepas con un origen común presentaron un patrón de bandas idéntico, aunque se encontraron dos cepas con un mismo patrón de bandas procedentes de muestras de aire (F20VO) y de leche de tanque de otra explotación diferente (M313VO).

En 15 de los pulsotipos aparecen cepas de un mismo origen (leche de tanque, agua o muestras clínicas), mientras que los 9 restantes albergan cepas de diferentes orígenes:

- **Pulsotipo I:** se agrupan cepas aisladas de muestras de leche de tanque que presentan un 81,5% de similitud con una cepa procedente de una muestra de agua de una explotación diferente.
- **Pulsotipo IV:** de forma similar a lo descrito para el pulsotipo I, este pulsotipo incluye una cepa aislada de una muestra de agua que presenta una similitud del 89,7% con una procedente de una muestra de leche de tanque de otra explotación diferente.
- **Pulsotipo V:** incluye dos cepas de origen ovino, una aislada de leche de tanque y otra de heces de diferentes explotaciones, con un nivel de similitud del 81,3%.
- **Pulsotipo VI:** está formado por dos cepas, una aislada de leche de tanque y otra de origen humano, con una similitud del 87,5%.
- **Pulsotipo VII:** formado por una cepa aislada de heces de ovino que se agrupa con un 88,6% de similitud con dos cepas procedentes de muestras de leche y aire que, a su vez, presentan un mismo patrón de bandas.
- **Pulsotipo IX:** una cepa aislada de heces ovinas forma un “cluster” (85,7% de similitud) con una cepa de origen humano.
- **Pulsotipo XV:** comprende dos cepas, una aislada de leche de tanque y otra de origen humano, con un 79% de similitud.
- **Pulsotipo XVII:** “cluster” formado por dos cepas aisladas de leche de tanque y una cepa aislada de agua de otra explotación diferente (82,5% de similitud).
- **Pulsotipo XVIII:** está formado por dos cepas procedentes de explotaciones diferentes, una aislada de leche de tanque y otra de agua, con un 83,9% de similitud.

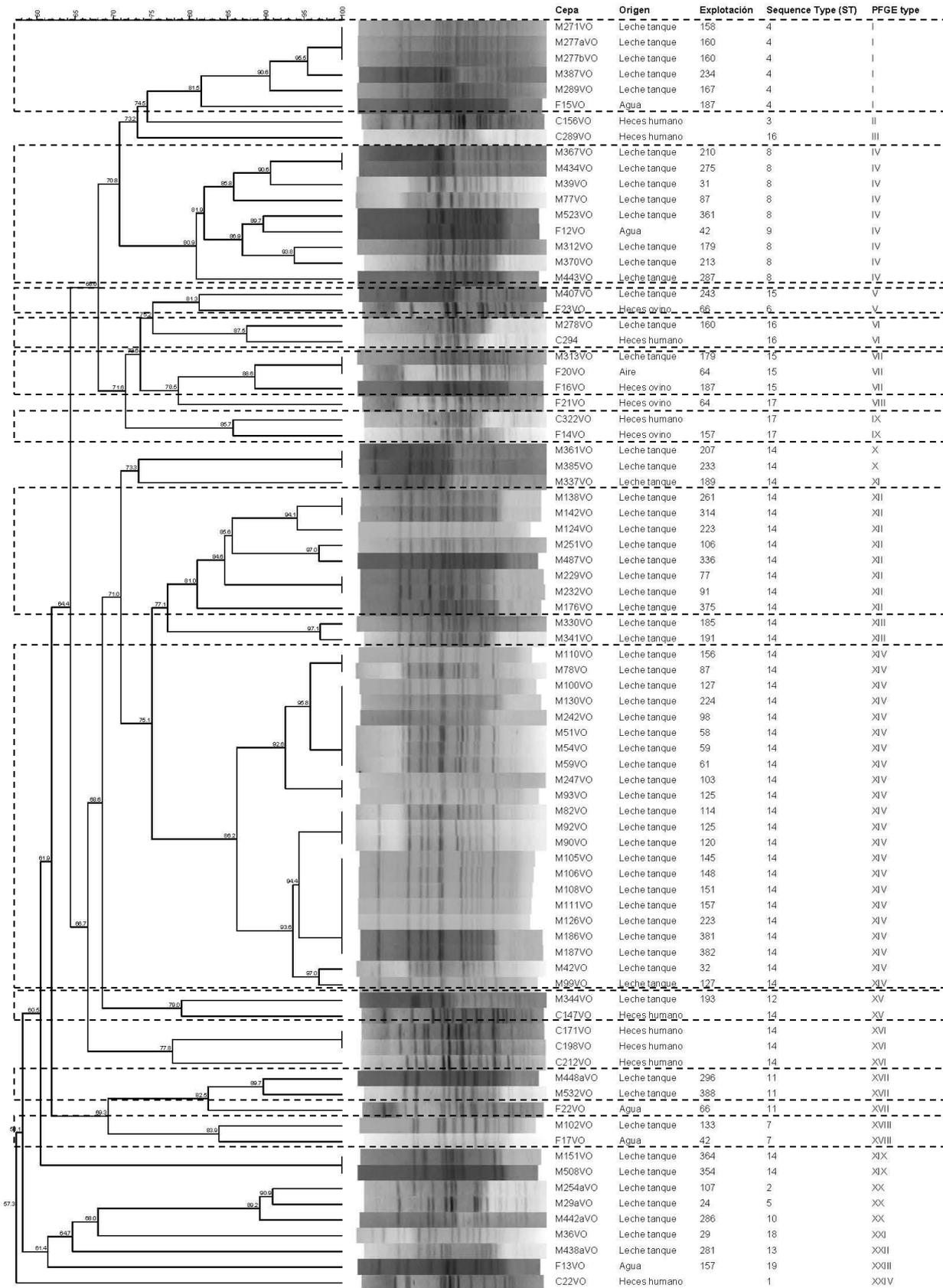


Figura III.6. Dendrograma XbaI-PFGE que muestra la relación genética entre las 81 cepas EPEC de origen ovino y humano. Además incluye los “Sequence Types” (STs) obtenidos mediante tipificación por MLST.

DISCUSIÓN

De los 62 aislados procedentes de muestras de leche de ovino, solo el 69,4% fueron identificadas como *E. coli* por el sistema Api® 20E. Por tanto, y como ya se observó en el estudio de las cepas de STEC (Capítulo II), este sistema miniaturizado no es útil para la identificación de cepas de ciertos grupos patógenos de la especie *E. coli*.

Ninguna de las 81 cepas aisladas (incluidas las nueve procedentes de pacientes con diarrea del Hospital de León) presentó el gen *bfpA* ni el plásmido de adherencia pEAF, por lo que todas ellas se clasificaron como aEPEC. Esto confirma observaciones previas que indican que las cepas aEPEC son más frecuentes que las tEPEC en los países desarrollados y que se aíslan de diferentes especies de animales de abasto (Trabulsi et al., 2002; Hernandez et al., 2009).

Mediante el uso de la técnica MLST se obtuvieron 19 perfiles de alelos. Éstos STs pueden considerarse nuevos puesto que ninguno de ellos ha sido publicado en trabajos científicos anteriores cuando se han utilizando los genes “housekeeping” empleados por nosotros (Leomil et al., 2005; Moura et al., 2009). En nuestro estudio, el análisis por MLST permitió distinguir tres grupos clonales que incluían cepas de diferentes orígenes. El primer grupo clonal obtenido, constituido por siete STs, estaba formado por 13 cepas, que a su vez, estaban recogidas en 6 pulsotipos diferentes. En el ST de origen (ST 5; Figura III.3) se incluyó una única cepa procedente de leche; los STs 2 y 10 (con una sola variación en un *locus*) incluyeron, cada uno de ellos, una única cepa procedente de leche; los ST 6, ST 7, ST 15 y ST 17 (con variaciones en dos *loci*), incluían cepas procedentes de muestras de leche, heces, aire y agua. El segundo de los grupos clonales se formó con dos STs; el ST 3, que incluía una cepa de origen humano; y el ST 4, en el que se incluían cinco cepas procedentes de muestras de leche y otra procedente de agua. A su vez, estas siete cepas formaban parte de dos pulsotipos diferentes. El tercer grupo clonal estaba constituido por el ST 8, en el que se incluyeron ocho cepas procedentes de muestras de leche, y el ST 9 formado exclusivamente por una cepa procedente de agua. Estas nueve cepas se recogen en el pulsotipo I. Así pues, estos datos obtenidos del estudio por MLST de las cepas de EPEC indican una clara relación entre cepas procedentes de muestras de leche y agua.

Los 19 perfiles alélicos (MLST), junto con los 24 pulsotipos obtenidos, muestran un elevado grado de heterogeneidad filogenética entre las cepas estudiadas. Esta diversidad genética parece ser un rasgo característico de las cepas aEPEC como recogen publicaciones previas (Afset et al., 2008). A pesar de esta heterogeneidad, la comparación de cepas ovinas (aisladas de muestras de leche y de diferentes orígenes en las explotaciones) con cepas de origen humano procedentes de pacientes con diarrea del Hospital de León muestra una clara relación epidemiológica; así, el ST mayoritario (ST 14) estaba compuesto por cepas de estos dos orígenes. Esta relación quedó demostrada también mediante el análisis PFGE (pulsotipos VI y XV). Otro hallazgo interesante en este estudio fue la relación encontrada entre cepas procedentes de muestras de leche y de agua. De hecho, cepas de ambos orígenes se agruparon en dos STs y cuatro pulsotipos.

El hombre es considerado el único reservorio de tEPEC. En la Introducción de este Capítulo se señaló que se han publicado estudios en los que se demuestra que se han aislado cepas de aEPEC tanto de animales sanos y enfermos de diferentes especies, en la mayoría destinadas a la producción de alimentos, aunque también de animales de compañía y animales salvajes (Silva et al., 2001; Holko et al., 2006; García Díez et al., 2009; Bandyopadhyay et al., 2012). Por tanto, diferentes especies animales pueden actuar como reservorio de estos microorganismos y representar una fuente de infección para humanos, tal y como otros autores han sugerido (Blanco et al., 2005; Moura et al., 2009). Los resultados obtenidos en este estudio no permiten determinar con exactitud las rutas de transmisión de aEPEC, pero indican que cepas presentes en leche de ovino están genéticamente relacionadas con cepas aisladas de procesos humanos. El origen de la contaminación de la leche con cepas de aEPEC no está bien esclarecido, pero la similitud encontrada entre cepas procedentes de leche y agua sugieren una posible vía de contaminación a través del agua utilizada en la explotación, tanto el agua de bebida de los animales como el agua utilizada para la limpieza de los equipos. Robins-Browne et al. (2004) observaron que una importante causa de gastroenteritis humanas eran cepas de aEPEC presentes en el agua de bebida; por otro lado, García-Díez et al. (2009) encontraron que las características moleculares de aislados de aEPEC obtenidos de muestras de aguas superficiales eran similares a las

detectadas en cepas procedentes de muestras humanas. Estos estudios, junto con los resultados que se presentan en este trabajo, sugieren que el agua puede constituir una ruta para la contaminación de la leche de ovino por cepas atípicas de EPEC.

En resumen, los resultados de este estudio sugieren que el agua de las explotaciones de ovino puede constituir una vía importante de contaminación de la leche por aEPEC. Además, la presencia en leche de ovino de cepas aEPEC relacionadas con otras causantes de enfermedad en humanos indica una posible ruta de transmisión de estos patógenos emergentes con el consiguiente riesgo para la salud.

BIBLIOGRAFÍA

1. Afset, J. E., Anderssen, E., Bruant, G., Harel, J., Wieler, L. and 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.
2. Bandyopadhyay, S., Lodh, C., Rahaman, H., Bhattacharya, D., Bera, A., Ahmed, F., Mahanti, A., Samanta, I., Mondal, D. and Sarkar, S. 2012. Characterization of shiga toxin producing (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in raw yak (*Poephagus grunniens*) milk and milk products. Res. Vet. Sci., <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.12.011>.
3. Blanco, M., Schumacher, S., Tasara, T., Zweifel, C., Blanco, J. E., Dahbi, G., Blanco, J. and Stephan, R. 2005. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-η2*). BMC Microbiol., 5: 23.
4. Chen, H. D. & Frankel, G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. FEMS Microbiol. Rev., 29: 83-98.
5. Franke, J., Franke, S., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Wieler, L. H., Baljer, G., Beutin, L. and Karch, H. 1994. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. J. Clin. Microbiol., 32: 2460-2463.

Capítulo III. Bibliografía

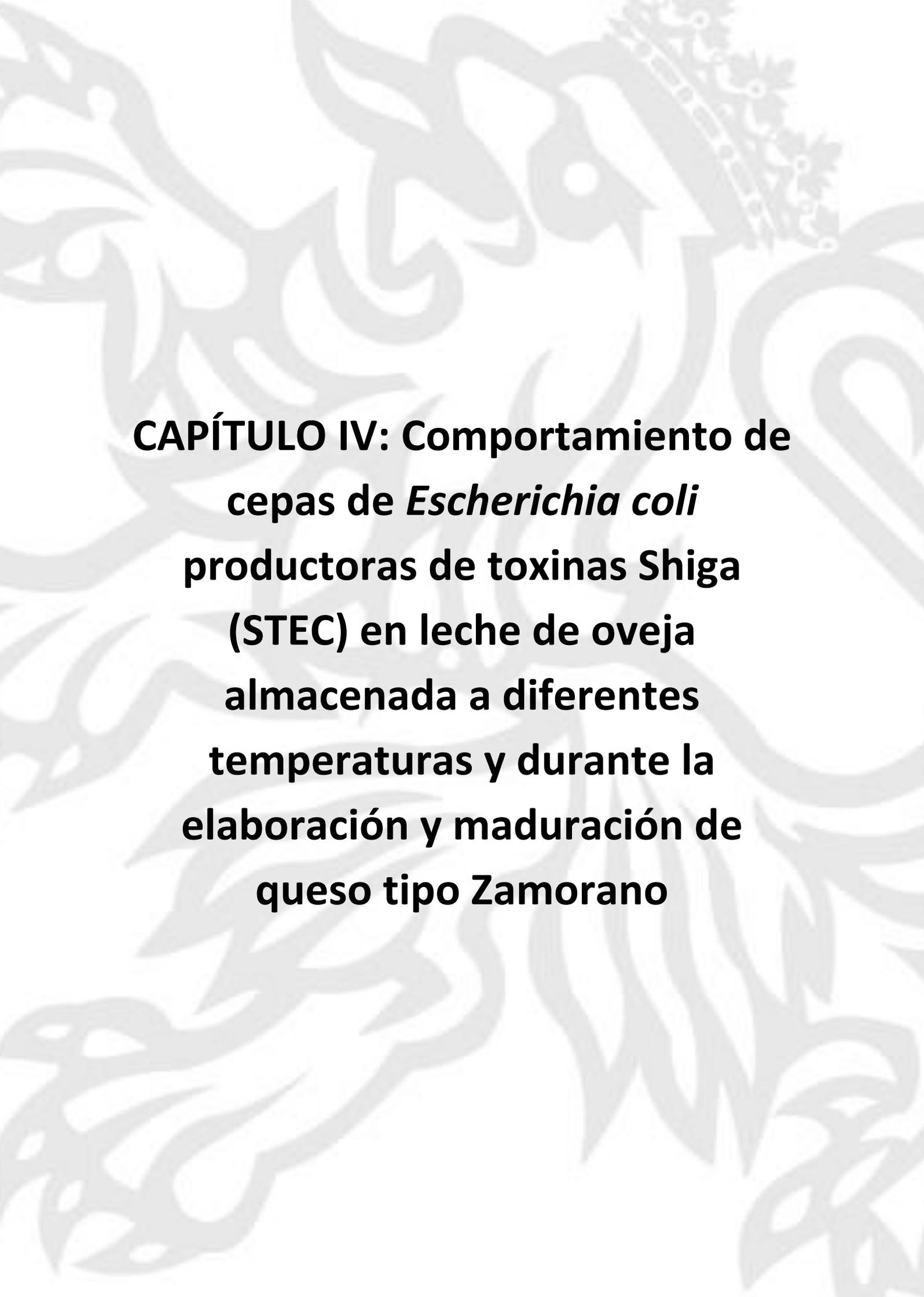
6. García Díez, M., Meindl, K., Fräßdorf, J., Wolf, S., Schalch, B. and Busch, U. 2009. Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in food and water in Bavaria in 2007. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 5: 77-81.
7. Gunzburg, S. T., Tornieporth, N. G. and Riley, L. W. 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 1375-1377.
8. Hernandez, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A. M. and Gomes, T. A. T. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 297: 137-149.
9. Holko, I., Bisova, T., Holkova, Z. and 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.
10. Jolley, K. A., Feil, E. J., Chan, M. S. and Maiden, M. C. 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics*, 17: 1230-1231.
11. Leomil, L., Pestana de Castro, A. F., Krause, G., Schmidt, H. and Beutin, L. 2005. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 249: 335-342.
12. Moura, R. A., Sircili, M. P., Leomil, L., Matté, M. H., Trabulsi, L. R., Elias, W. P., Irino, K. and de Castro, A. F. P. 2009. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 7399-7408.

Capítulo III. Bibliografía

13. Olsen, J. E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P. E., Popovic, T., Rasmussen, H. N. and Olsvik, O. 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, 28: 1-78.
14. Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marchès, O. and Caprioli, A. 2000. Typing of intimin genes in human and animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*, 68: 64-71.
15. Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D. and 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.
16. Robins-Browne, R. M., Bordun, A., Tauschek, M., Bennett-Wood, V. R., Russell, J., Oppedisano, F., Lister, N. A., Bettelheim, K. A., Fairley, C. K. and Sinclair, M. I. 2004. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerging infectious diseases*, 10: 1797.
17. Silva, Z. N., Cunha, A. S., Lins, M. C., Carneiro, L. A. M., Almeida, A. C. F. and Queiroz, M. L. P. 2001. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Rev. Saúde Pública*, 35: 375-379.
18. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731-2739.

Capítulo III. Bibliografía

19. Trabulsi, L. R., Keller, R. and Gomes, T. A. T. 2002. Typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 508.



**CAPÍTULO IV: Comportamiento de
cepas de *Escherichia coli*
productoras de toxinas Shiga
(STEC) en leche de oveja
almacenada a diferentes
temperaturas y durante la
elaboración y maduración de
queso tipo Zamorano**

INTRODUCCIÓN

Se han publicado numerosos trabajos que estudian el comportamiento de microorganismos patógenos en leche y productos lácteos. En el caso de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, la mayor parte de los estudios se centran en el serotipo O157:H7, siendo la información relativa a otros serogrupos y serotipos de STEC bastante limitada (Farrokh et al., 2013). Algunos de los parámetros que influyen en la multiplicación y supervivencia de STEC durante el almacenamiento de la leche y durante los procesos de elaboración y maduración de los quesos se revisan a continuación.

1. TEMPERATURA

Como ya se ha señalado en la Introducción general, la mayoría de las cepas de *E. coli* se multiplican en el rango 10-46°C, presentando algunas de ellas capacidad para hacerlo a temperaturas de 8°C. Ciertos serotipos de STEC pueden, incluso, crecer en leche a temperaturas tan bajas como 6,5°C. Se ha puesto de manifiesto que hay cepas de *E. coli* O157 que poseen mecanismos genéticos que les permiten multiplicarse a temperaturas mínimas inferiores a las de cepas de *E. coli* no patógenos. Por otro lado, la supervivencia de este serogrupo parece ser mayor a bajas temperaturas (2-5°C) que a temperaturas superiores a 7° C (Erickson & Doyle, 2007; Farrokh et al., 2013).

Las cepas de STEC no presentan una especial resistencia al calor en condiciones de pH neutro y actividad de agua (a_w) moderadamente elevada (D_{60} para *E. coli* O157:H7, 45 segundos), siendo, por tanto, inactivadas por los tratamientos HTST ("High Temperature Short Time" -72 °C, 15 segundos-) de pasteurización de la leche. Sin embargo, el estrés ambiental puede inducir termotolerancia en algunas cepas. Así, se ha observado que la exposición a calor suave o la protección cruzada inducida durante la adaptación al medio ácido aumentan la termotolerancia por la activación de genes de respuesta al estrés. Además, la grasa de los alimentos presenta un efecto protector frente a la inactivación térmica (Farrokh et al., 2013).

Por lo que respecta a las temperaturas utilizadas durante el proceso de maduración de los quesos, éstas no parecen ser un factor decisivo en la supervivencia

de STEC puesto que algunos trabajos indican que *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir a una temperatura de 2°C durante 60 o 75 días en quesos Camembert y Feta, respectivamente, y hasta 60 días a 7°C en queso Cheddar (Farrokh et al., 2013).

2. pH

El pH óptimo para el crecimiento de cepas de *E. coli* O157:H7 se halla en valores próximos a 7 aunque hay cepas capaces de hacerlo en un rango que oscila entre 4,5 y 9. Por tanto, estos microorganismos encuentran un pH adecuado para su proliferación en la leche (pH en torno a 6-7). Además, algunas cepas de *E. coli* O157:H7 son acidorresistentes pudiendo llegar a tolerar valores de pH tan bajos como 2 o 3 (Welch, 2006; Farrokh et al., 2013); por tanto, su presencia en alimentos de acidez moderada, como por ejemplo algunos tipos de quesos, podría comprometer su inocuidad. Hay que recordar que, durante el proceso de elaboración del queso, las bacterias acidolácticas (BAL) producen ácidos orgánicos dando lugar a un descenso del pH hasta valores próximos a 4,5. La adaptación de *E. coli* O157:H7 a la acidez del queso podría permitir también una mayor supervivencia de esta bacteria durante su paso por el ambiente ácido del estómago (Farrokh et al., 2013).

3. CONCENTRACIÓN DE SAL Y a_w

Durante la elaboración del queso existe una etapa de salado que se aplica para conseguir, entre otros fines, la disminución de la a_w del producto y consecuentemente controlar el crecimiento microbiano. La a_w mínima necesaria para la multiplicación de *E. coli* es de 0,945-0,950, por lo que este no será un factor limitante para el crecimiento de esta bacteria en leche aunque sí en ciertas variedades de queso. Por otro lado, se ha comprobado que *E. coli* O157:H7 es inhibido completamente en medios líquidos con concentraciones de NaCl $\geq 8,5$ g/100 g, si bien podría multiplicarse después de 36 h de fase de latencia en presencia de concentraciones de 6,5 g/100 g (Jay et al., 2005).

4. INTERACCIONES MICROBIANAS

Tanto los microorganismos presentes en la leche como las BAL utilizadas como cultivo iniciador en la fabricación del queso son una competencia natural para la

multiplicación de STEC. Aunque se conoce poco sobre los mecanismos por los que se produce esta interacción, se considera que entre estos se encuentran la producción por parte de las BAL de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo y bacteriocinas (Farrokh et al., 2013).

OBJETIVO:

Los objetivos del trabajo presentado en este Capítulo fueron tres: 1) investigar la resistencia de cepas STEC a diferentes valores de acidez, 2) determinar la evolución de cepas STEC en leche de oveja mantenida a diferentes temperaturas y 3) conocer el comportamiento de una cepa de *E. coli* O157:H7 durante el proceso de elaboración y maduración de un queso tipo Zamorano.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. RESISTENCIA A LA ACIDEZ DE CEPAS STEC

Un total de 50 cepas STEC (tres pertenecientes al serotipo O157:H7 y 47 no-O157:H7) procedentes de leche de tanque fueron estudiadas para determinar su resistencia a la acidez y, en función de ello, seleccionar las dos cepas más resistentes (una perteneciente al serotipo O157:H7 y otra no-O157:H7) para los estudios posteriores.

Las cepas STEC aisladas de leche de tanque de explotaciones del Consorcio de Promoción del Ovino (CPO) se sembraron en placas de Sorbitol MacConkey Agar (SMAC, Oxoid, Basingstoke, UK) y fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una colonia de cada una de las placas y se transfirió a tubos con caldo Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) con un 0,3% de ácido láctico (Panreac Química, S.L.U, Barcelona, España). Se utilizó un blanco de reacción sin microorganismo (caldo TSB + ácido láctico) y un control positivo sin ácido láctico (caldo TSB + cepa de *E. coli*). Se incubaron los tubos a 37°C y se midieron las absorbancias (620 nm) de los caldos después de 3, 6, 9 y 24 horas de incubación. Las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro Multiskan FC microplate (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

2. COMPORTAMIENTO DE CEPAS STEC EN LECHE CRUDA Y PASTERIZADA DE OVINO ALMACENADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS

Para este estudio se utilizaron las dos cepas seleccionadas en el apartado anterior (una perteneciente al serotipo O157:H7 y otra STEC no-O157:H7).

La leche de oveja fue facilitada por la granja de la Universidad de León y transportada mediante una nevera isoterma hasta el laboratorio en menos de una hora. Se almacenó a refrigeración hasta su posterior uso. Una parte de esta leche fue sometida a una pasterización baja (LHT) manteniéndola a 63°C durante 30 minutos. La otra parte no se trató térmicamente.

Se estudiaron muestras de leche, por triplicado, en las siguientes condiciones:

- Leche cruda inoculada con *E. coli* O157:H7.
- Leche pasteurizada inoculada con *E. coli* O157:H7.
- Leche cruda inoculada con *E. coli* no-O157:H7.
- Leche pasteurizada inoculada con *E. coli* no-O157:H7.
- Leche cruda no inoculada.
- Leche pasteurizada no inoculada.

Las muestras inoculadas consistían en 20 ml de leche con una concentración final de *ca.* 10^2 ufc/ml de cada una de las cepas de STEC seleccionadas. Se eligió este nivel de inóculo teniendo en cuenta dos factores; por un lado, los bajos niveles de estas bacterias detectados en los muestreos descritos en el Capítulo I (fue necesario un enriquecimiento de las muestras para la obtención de aislados) y, por otro, la cantidad mínima de inóculo que permitía realizar recuentos.

Todas las muestras se almacenaron a diferentes temperaturas durante 5 días. Estas temperaturas se seleccionaron de acuerdo con las exigencias recogidas en el Reglamento (CE) Nº 853/2004 (Anónimo, 2004), por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Así, las temperaturas elegidas fueron:

- 6°C: Temperatura máxima de la leche en granja si la recogida no es diaria.
- 8°C: Temperatura máxima de la leche en granja si la recogida es diaria.
- 10°C: Temperatura máxima de la leche durante el transporte al establecimiento de destino.
- Simulación de fallos en la cadena de frío. La secuencia de temperaturas y tiempos se detallan en la Figura IV.1. Se simuló un fallo en el mantenimiento de la temperatura durante la carga del camión cisterna para el transporte de la leche desde la granja al CPO, y otro fallo durante la carga de la leche para el transporte desde el CPO a la industria.

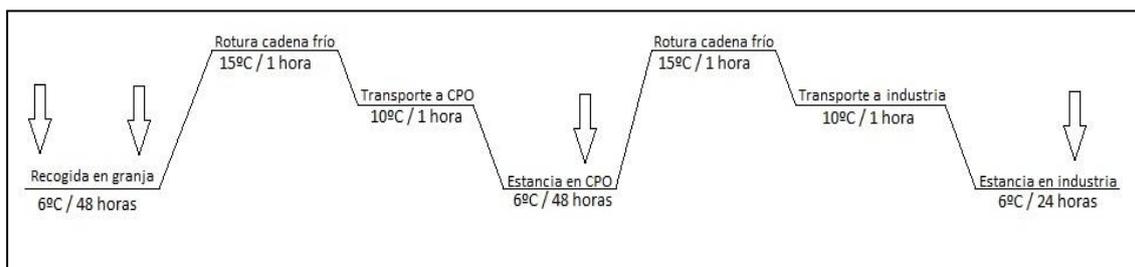


Figura IV.1. Secuencia de temperaturas y tiempos para la simulación de fallos en la cadena de frío de leche de ovino. Las flechas indican los puntos en los que se realizaron los análisis microbiológicos.

Las temperaturas utilizadas durante el almacenamiento de las muestras fueron controladas mediante el uso de un termómetro Testo 175-T2 (Instrumentos Testo, S.A., Cabriels, Barcelona). Éste termómetro fue programado para la toma de temperaturas cada 10 minutos con una precisión de 0,2°C.

En cada una de las muestras se realizaron análisis microbiológicos para estudiar el desarrollo de las cepas STEC a tiempo 0, a las 48 h (momento de recogida de la leche en las explotaciones), a las 96 h (almacenamiento en el CPO) y 120 h (almacenamiento en la industria). Para el experimento de simulación de fallos en la cadena de frío, las mediciones se realizaron a tiempo 0, a las 46 h (antes de la carga de la leche en granja), a las 94 h (después del transporte y almacenamiento durante 41 h en el CPO) y 127 h (después del segundo fallo en la cadena de frío y durante el almacenamiento en la industria).

Para los análisis microbiológicos se realizaron diluciones y siembras en superficie (100 µl) utilizando medios de cultivo diferentes en función de que fuera leche pasteurizada o cruda. En las muestras de leche pasteurizada, los análisis microbiológicos se realizaron utilizando placas de agar SMAC (Oxoid). Este medio era suficiente para el recuento de las cepas inoculadas una vez que la mayor parte de la microbiota inicial fue eliminada durante el proceso de pasteurización. Por otro lado, en las muestras de leche cruda se utilizó CHROMagarTM O157 (Scharlab, Barcelona, España), medio específico para el aislamiento y diferenciación del serogrupo O157, suplementado con Cefixima y Telurito (CT, Oxoid). Este medio cromogénico permitía diferenciar las colonias de *E. coli* O157:H7 (color malva) de las de *E. coli* no-O157:H7

(color azul metálico) de otras colonias originarias de la microbiota inicial de la leche cruda. Todas las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

3. COMPORTAMIENTO DE CEPAS STEC EN QUESO MADURADO DE OVEJA

En primer lugar, se elaboraron quesos tipo Zamorano con las características y el método de elaboración indicado en el Reglamento de la Denominación de Origen “Queso Zamorano” (Anónimo, 1993). Según este, el queso Zamorano presentará las siguientes características una vez finalizada su maduración:

Forma: Cilíndrica con caras sensiblemente planas.

Altura: Hasta un máximo de 14 centímetros.

Diámetro: Hasta un máximo de 24 centímetros.

Peso: Hasta un máximo de 24 kilogramos.

Corteza: Dura, de color amarillo pálido o gris oscura y bien definida.

Pasta: Firme y compacta de color variable desde el blanco hasta el marfil-amarillento, pudiendo presentar ojos pequeños o puntitos, repartidos por todo el corte. Aroma y sabores característicos, bien desarrollados e intensos, persistentes al paladar.

Grasa: No inferior al 45 por 100 sobre el extracto seco.

Extracto seco: Mínimo 55 por 100.

Proteína total: Mínimo 25 por 100.

pH: 5,1 a 5,8.

De este modo, se obtuvieron quesos a partir de leche cruda de ovino inoculada con la cepa de *E. coli* O157:H7 seleccionada (lote 1), y quesos con las mismas características a partir de leche sin inocular (lote 2). En todos los quesos elaborados se estudió la evolución de los parámetros pH, a_w y contenido en sal a lo largo de su proceso de elaboración y maduración. Para cada tipo de queso, a partir de leche inoculada y sin inocular, la fabricación se realizó por triplicado.

Para la elaboración de cada lote se utilizaron 12 litros de leche cruda de ovino procedente de la granja de la Universidad de León. El proceso de elaboración fue el mismo en ambos lotes (Figura IV.2), salvo que la leche del lote 1 se contaminó

intencionadamente con una concentración final de *ca.* 10^3 ufc/ml de la cepa seleccionada. Este nivel de inóculo fue elegido considerando el nivel máximo de *E. coli* O157:H7 que se podría detectar (“peor escenario posible” en carne picada y en leche) (ICMSF, 2002; Schlessner et al., 2006).

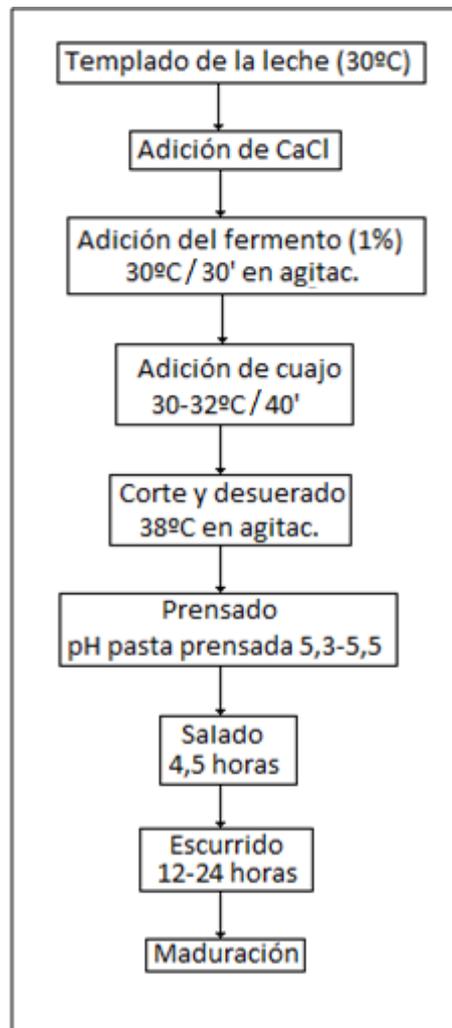


Figura IV.2. Diagrama de flujo del proceso seguido para la de elaboración de queso tipo Zamorano.

El proceso de elaboración de los quesos que se representa en la Figura IV.2 consistió en las siguientes etapas:

- Pre calentamiento de la leche a 30°C con agitación continua y medición del pH (Testo 205, Instrumentos Testo).
- Adición de cloruro cálcico (Laboratorios Arroyo, Peñacastillo, Santander, España) en proporción de 1 l de producto en 8000 l de leche sin pasteurizar.

- Adición del cultivo iniciador (Danisco Choozit MA4001 LYO 05DCU, Danisco, Sassenage, Francia) en concentración del 1%. Se permitió su actuación durante unos 30 minutos a 30°C hasta que el pH descendió en 0,1 unidades. El fermento se preparó disolviendo en leche y se conservó a 32°C durante toda la noche para su utilización al día siguiente.
- Adición de cuajo diluido en agua para obtener una concentración de 1:10.000 (Laboratorios Arroyo). Se mantuvo a 30-32°C durante unos 40 minutos hasta la formación óptima de la cuajada (suero claro y al cortarla en forma de T se levantaba entera).
- Desuerado: se cortó y agitó la cuajada hasta conseguir trozos del tamaño de un “grano de arroz”, aumentando la temperatura simultáneamente hasta que se alcanzaron 38°C.
- Prensado: se sacaron los granos de cuajada separados del suero y se introdujeron en tres moldes para posteriormente prensar hasta que el pH llegó a 5,5 aproximadamente. Se realizó un primer prensado durante 40 minutos, volteando los quesos para llevar a cabo un segundo prensado más intenso durante las siguientes nueve horas.
- Salado: en una salmuera con un 20% de sal, añadiendo ácido láctico hasta que el pH alcanzó un valor similar al de los quesos. Se mantuvo en la salmuera durante 4 horas y media a 8-10°C. Se voltearon los quesos transcurrida la mitad del tiempo de salado.
- Ecurrido: a temperatura ambiente durante 12-24 horas.
- Maduración, en las condiciones siguientes:
 - Temperatura: 10-12°C
 - HR: 85-90%
 - Tiempo: 2 meses (periodo mínimo de maduración para quesos elaborados con leche cruda de la especie ovina en zonas geográficas no oficialmente indemnes de brucelosis según el Real Decreto 640/2006) (Anónimo, 2006). Durante la maduración se voltearon los quesos regularmente para conseguir una distribución homogénea de la sal.

Se realizaron los recuentos de la cepa de *E. coli* O157:H7 y de bacterias BAL a lo largo del proceso de elaboración de los quesos. También se midieron el pH y la a_w . Todos estos parámetros fueron obtenidos en los siguientes puntos:

- Inicialmente en la leche cruda. En este punto no se realizó el recuento de BAL.
- Una vez separada la cuajada del suero, después del primer prensado.
- Después del salado.
- Una vez finalizado el escurrido.
- A las 24 horas, una semana, un mes y dos meses del comienzo de la maduración.

Además, después de la etapa de salado, se realizaron mediciones del contenido en sal en estas mismas fases.

Para el recuento de *E. coli* O157:H7 se procedió de diferente modo en función de la matriz alimentaria:

- a) A partir de la leche se realizó una siembra directa en superficie (100 μ l) en el medio CHROMagarTM O157 (Scharlab).
- b) En el caso de la cuajada y el queso, se tomaron 10 g del producto y se homogeneizaron en un BagMixer-400 blender (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, Francia) durante un minuto con 40 ml de TSB (Oxoid) con Yeast Extract (YE, Oxoid) al 0,6%. A partir de las correspondientes diluciones decimales, se sembraron alícuotas de 400 μ l en la superficie de placas (150 mm de diámetro) de CHROMagar. De esta manera se amplió el límite de detección hasta 6,25 ufc/g.

Las placas de CHROMagar se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se realizó el recuento de las colonias expresando el resultado en ufc/ml o ufc/g según correspondía. El homogeneizado inicial además se incubó a 42°C durante toda la noche para, en caso de que no se detectara ninguna colonia en las placas de cultivo, comprobar la supervivencia de la cepa por siembra a partir de este enriquecimiento en nuevas placas de CHROMagar.

Para el recuento de las BAL, partiendo del homegeneizado para la determinación de *E. coli* O157:H7, se realizaron las oportunas diluciones decimales desde las que se sembraron en profundidad (1 ml) placas de medio "Agar Man, Rogosa y Sharpe" (MRS, Oxoid) con sobrecapa final del mismo medio de cultivo. Posteriormente se incubaron las placas a 30°C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de las colonias expresando el resultado en ufc/g.

La medición del pH se realizó con un pHmetro de punción (Testo 205, Instrumentos Testo) en los puntos señalados anteriormente.

En el caso de la determinación de la a_w , se utilizó el equipo AquaLab modelo CX-2 (Decagon, Pullman, WA, USA). Se colocaron las muestras en los recipientes facilitados por el fabricante cubriendo completamente el fondo y no sobrepasando la mitad de su capacidad. Se introdujeron estas muestras en el aparato a temperatura ambiente y se procedió a su lectura.

Finalmente, se determinó el contenido de NaCl mediante el método oficial de determinación de cloruros en queso descrito por Vohlard según la Norma AOAC 935.43 (Bradley, 2006) . El proceso consistió en lo siguiente:

- En un matraz de 250 ml se pesaron 3 gramos de queso, añadiendo a continuación 25 ml de nitrato de plata 0,1N (Panreac Química) y 25 ml de ácido nítrico al 60% (Panreac Química).
- Se agitó la mezcla y se llevó a ebullición, añadiendo a continuación y muy lentamente 15 ml de una solución saturada de permanganato potásico (Panreac Química).
- Se retiró el matraz del fuego y se añadieron 100 ml de agua destilada y 2 ml de una solución saturada de sulfato férrico-amónico (Panreac Química), mezclando el contenido adecuadamente.
- Finalmente, se valoró el exceso de nitrato de plata con una solución de tiocianato potásico 0,1 N (Panreac Química) hasta la aparición de un color pardo-rojizo persistente durante 30 segundos.

- Se efectuó el ensayo de un blanco con agua destilada siguiendo el proceso descrito, exceptuando la incorporación del permanganato potásico utilizado para la digestión de la materia orgánica.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron procesados con el programa informático “Statistica for Windows v. 7” (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA, www.statsoft.com). Se calcularon los valores promedios y las desviaciones estándar. Los recuentos microbianos (ufc/ml o ufc/g) fueron previamente transformados y expresados como \log_{10} ufc/ml o \log_{10} ufc/g.

Se estimó la relación lineal entre los parámetros investigados en los diferentes experimentos utilizando un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA): (a) entre las cepas STEC, el tiempo y los valores de absorbancia (resistencia a la acidez); (b) entre el tipo de tratamiento aplicado a la leche, la temperatura de conservación, el tiempo de almacenamiento y las cepas objeto de estudio (almacenamiento de la leche); (c) entre los valores de pH, a_w y contenido en sal, y los recuentos de BAL y *E. coli* O157:H7 durante la elaboración y maduración (tiempo de almacenamiento) de quesos tipo Zamorano.

Finalmente, se llevaron a cabo comparaciones por pares “post-hoc” de las medias mediante la prueba de Fisher de la menor diferencia significativa (Fisher’s Least Significant Difference test).

RESULTADOS

1. RESISTENCIA A LA ACIDEZ DE CEPAS STEC

En primer lugar se estudió la resistencia a la acidez de las tres cepas de *E. coli* O157:H7 (Figura IV.3). Se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de absorbancia registrados a lo largo del tiempo. Estos valores fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) para la cepa M240VO que para las cepas M462VO y M364VO a partir de 6 y 21 horas de incubación, respectivamente. Desde un punto de vista estadístico, las diferencias observadas en las absorbancias determinadas en las cepas M462VO y M364VO no fueron significativas ($p > 0,05$). Por tanto, la cepa M240VO fue seleccionada para las pruebas de comportamiento en leche y queso de oveja en base a su mayor resistencia a la acidez.

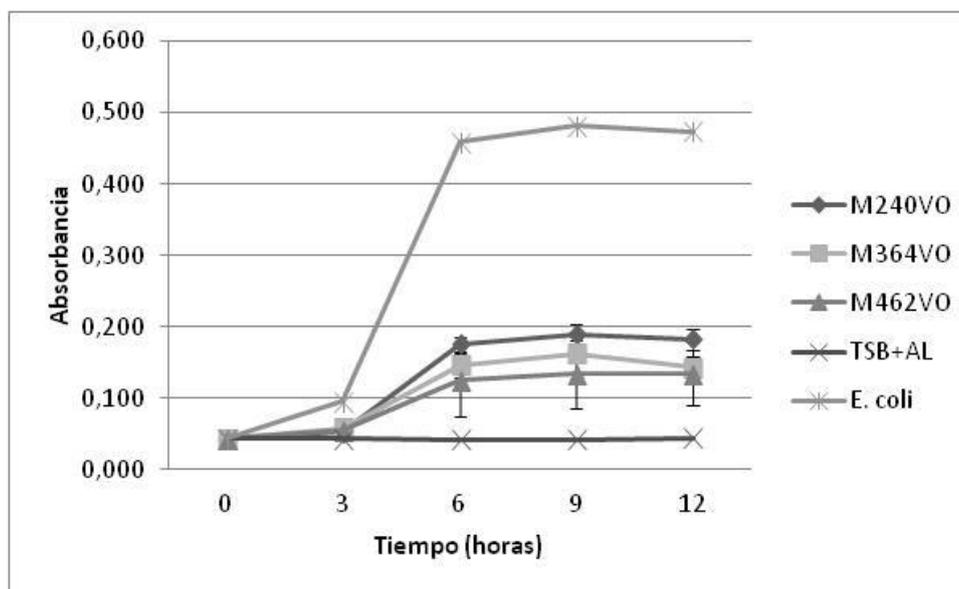


Figura IV.3. Evolución de los valores de absorbancia a 620 nm de cepas de *E. coli* O157:H7. TSB+AL, blanco de reacción (caldo TSB + ácido láctico 0,3%); *E. coli*, control positivo (caldo TSB sin ácido láctico).

En el caso de las cepas de *E. coli* no-O157:H7, la resistencia a la acidez determinada por la absorbancia observada (Figura IV.4), no difirió significativamente cuando se comparaba la cepa M294bVO con la siguiente más resistente (cepa M511VO). Sin embargo, a partir de seis horas de incubación los valores registrados de absorbancia para la cepa M294bVO se diferenciaron de aquéllos obtenidos en el resto

de cepas de *E. coli* no-O157:H7, mostrando así mayor resistencia a la acidez y siendo, por tanto, seleccionada para las posteriores pruebas de comportamiento.

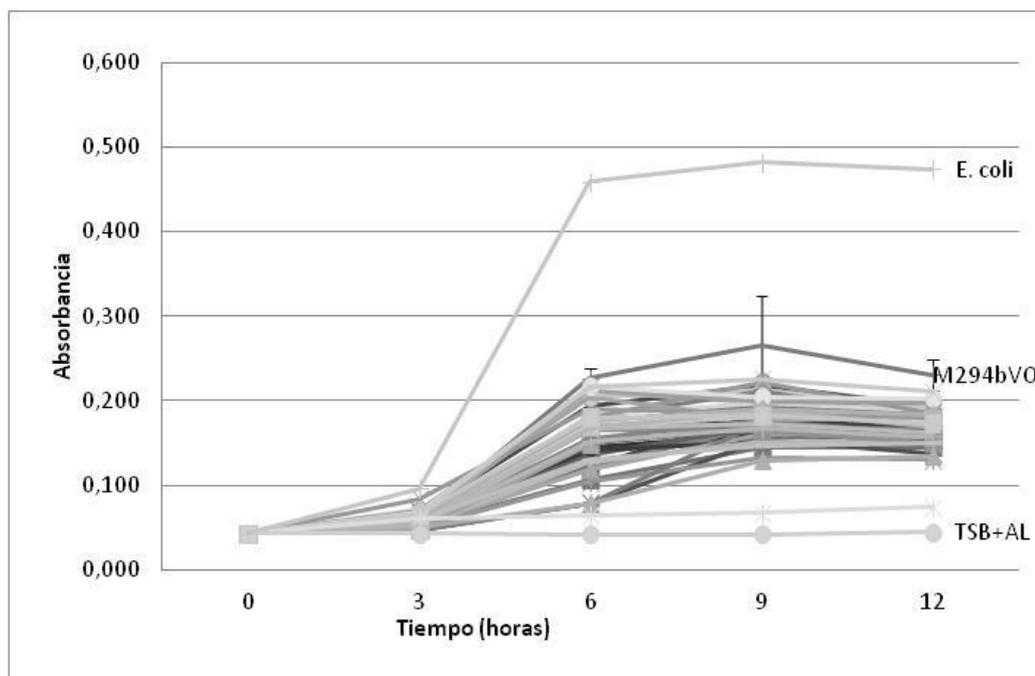


Figura IV.4. Evolución de los valores de absorbancia 620 nm de cepas *E. coli* no-O157:H7. TSB+AL, blanco de reacción (caldo TSB + ácido láctico 0,3%); *E. coli*, control positivo (caldo TSB sin ácido láctico).

2. COMPORTAMIENTO DE CEPAS STEC EN LECHE CRUDA Y PASTERIZADA DE OVINO ALMACENADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS

La monitorización de las temperaturas de almacenamiento (6°C, 8°C y 10°C) mostró variaciones muy pequeñas, en el rango de 0,1-0,4°C, mientras que en el caso del almacenamiento a 15°C la variación fue mayor (de hasta 0,7°C). Las desviaciones estándar de los registros obtenidos se encontraron entre $\pm 0,05$ y $\pm 0,14$. Por tanto, las temperaturas a las que fueron almacenadas las muestras se mantuvieron bastantes constantes y cercanas a las temperaturas nominales.

A partir de la selección de cepas realizada en el experimento anterior, se estudió el comportamiento de las cepas M240VO (*E. coli* O157:H7) y M294bVO (*E. coli* no-O157:H7) en leche cruda y LHT durante el almacenamiento a diferentes

temperaturas de refrigeración y en simulación de fallos de mantenimiento de la cadena de frío, cuyo resultados se presentan en la Tabla IV.1.

Los factores tratamiento de la leche, temperatura y tiempo de almacenamiento tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre los recuentos de las cepas. En general, el comportamiento de ambas fue similar, no observándose diferencias significativas.

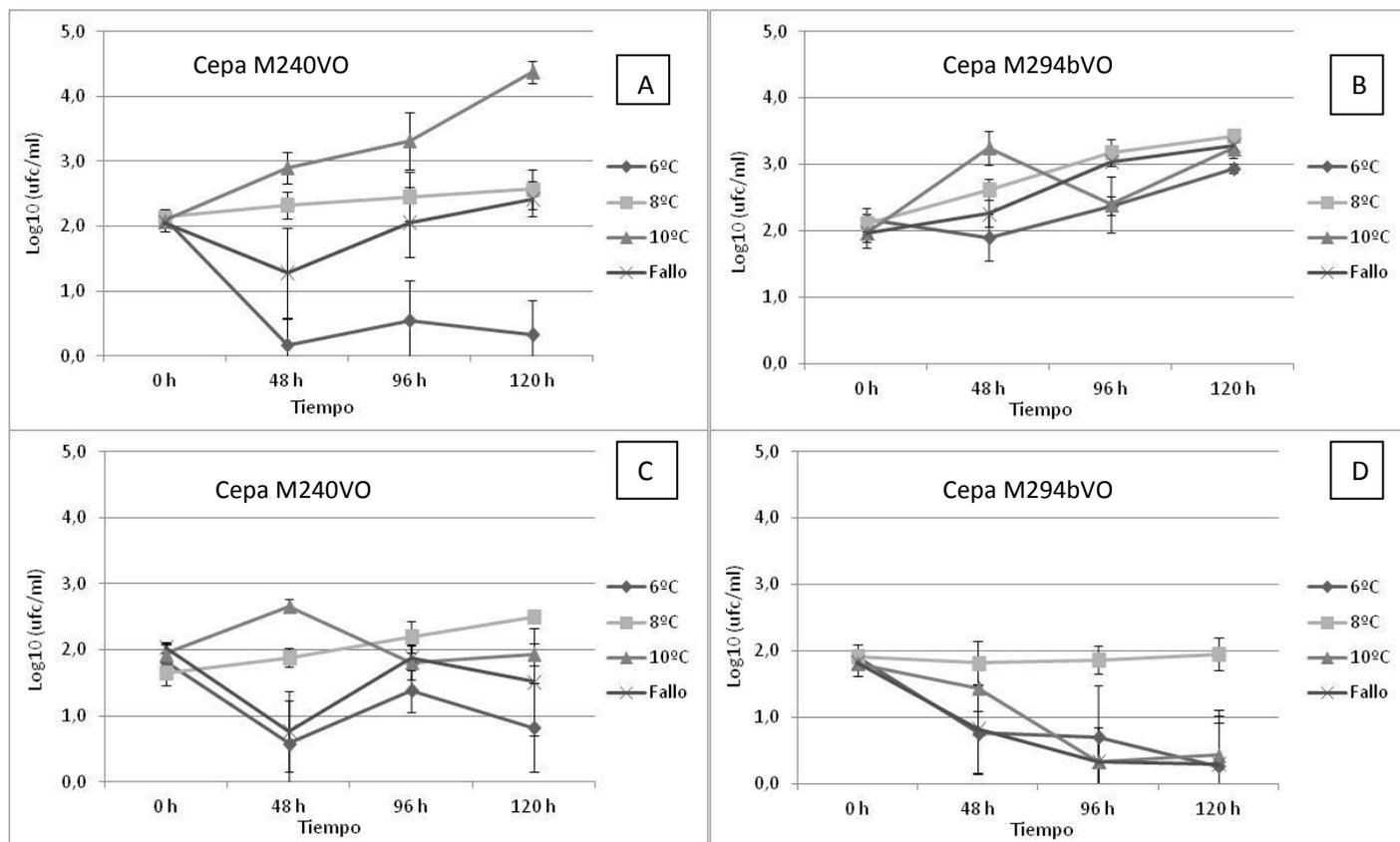


Figura IV.5. Evolución de los recuentos de cepas STEC en leche LHT (63°C/30 minutos) (A y B) y cruda (C y D).

Tabla IV.1. Comportamiento de dos cepas STEC (M240VO -*E. coli* O157:H7- y M294bVO -*E. coli* no-O157:H7-) en muestras de leche de oveja LHT (63°C/30 minutos) y cruda almacenadas a diferentes temperaturas.

LECHE	T ^a	RECuento (Log ₁₀ ufc / ml)							
		Cepa M240VO				Cepa M294bVO			
		0 h	48 h	96 h	120 h	0 h	48 h	96 h	120 h
LHT ^c	6 °C	^a 2,13 ± 0,09 ^{1 b}	0,17 ± 0,41 ²	0,55 ± 0,61 ²	0,33 ± 0,52 ²	2,17 ± 0,17 ¹	1,90 ± 0,35 ¹	2,38 ± 0,15 ²	2,94 ± 0,07 ³
	8 °C	2,14 ± 0,12 ¹	2,33 ± 0,21 ¹	2,45 ± 0,38 ¹	2,57 ± 0,30 ¹	2,10 ± 0,15 ¹	2,62 ± 0,16 ²	3,18 ± 0,20 ³	3,43 ± 0,05 ³
	10 °C	2,08 ± 0,16 ¹	2,90 ± 0,25 ²	3,31 ± 0,44 ²	4,37 ± 0,17 ³	1,97 ± 0,14 ¹	3,25 ± 0,25 ²	2,40 ± 0,42 ³	3,24 ± 0,15 ⁴
	Fallo ^d	2,06 ± 0,07 ¹	1,28 ± 0,70 ²	2,06 ± 0,54 ³	2,42 ± 0,27 ³	1,96 ± 0,21 ¹	2,26 ± 0,20 ¹	3,04 ± 0,06 ²	3,29 ± 0,08 ²
Cruda	6 °C	1,82 ± 0,26 ¹	0,58 ± 0,66 ²	1,38 ± 0,33 ³	0,82 ± 0,67 ⁴	1,92 ± 0,12 ¹	0,77 ± 0,61 ²	0,70 ± 0,78 ²	0,27 ± 0,65 ³
	8 °C	1,65 ± 0,19 ¹	1,88 ± 0,15 ¹	2,20 ± 0,24 ¹	2,49 ± 0,06 ¹	1,92 ± 0,17 ¹	1,82 ± 0,34 ¹	1,87 ± 0,21 ¹	1,95 ± 0,24 ¹
	10 °C	1,94 ± 0,15 ¹	2,66 ± 0,10 ²	1,80 ± 0,25 ³	1,93 ± 0,17 ³	1,81 ± 0,18 ¹	1,44 ± 0,35 ¹	0,33 ± 0,52 ²	0,43 ± 0,67 ²
	Fallo	2,04 ± 0,08 ¹	0,77 ± 0,61 ²	1,88 ± 0,20 ³	1,52 ± 0,81 ³	1,82 ± 0,11 ¹	0,83 ± 0,67 ²	0,33 ± 0,52 ³	0,30 ± 0,73 ³

^a Cada media ± desviación estándar representa el promedio de seis recuentos microbianos.

^b En cada fila y para cada temperatura de almacenamiento y cepa estudiada, superíndices diferentes en cada valor respecto al inmediatamente anterior indican diferencias significativas (p<0,05).

^c LHT, leche pasteurizada a baja temperatura (63 °C / 30 min).

^d Fallo, simulación de falta de mantenimiento de la cadena de frío.

Los recuentos de las cepas estudiadas al final del almacenamiento fueron significativamente mayores en las muestras de leche pasteurizada (Figura IV.5 A y B) que en las de leche cruda (Figura IV.5 C y D). En particular, los niveles de la cepa no-O157:H7 (M294bVO) fueron significativamente mayores en leche LHT a todas las temperaturas de almacenamiento (6°C, 8°C, 10°C y fallo en la cadena de frío), incrementándose éstos en 0,77 log ufc/ml a 6°C y en aproximadamente 1,30 log ufc/ml en el resto de temperaturas. Además, excepto a 6 °C, el aumento de los recuentos se produjo a las 48 h de almacenamiento. En el caso de la cepa O157:H7 (M240VO) inoculada en leche LHT, solo se observaron incrementos significativos durante el almacenamiento a 10°C y en la simulación de fallo en la cadena de frío (Tabla IV.1).

En leche cruda y para ambas cepas, el efecto de las temperaturas de refrigeración fue mucho más acusado que en leche LHT, incluso en las condiciones simuladas de fallo en la cadena de producción de frío. En este caso, la cepa M294bVO (no-O157:H7) se mostró más sensible, reduciéndose sus números a valores tan bajos como $0,27 \pm 0,65$ log ufc/ml (a 6 °C) o $0,30 \pm 0,73$ log ufc/ml (fallo en la cadena de frío).

Para la cepa M240VO (O157:H7), tanto en leche LHT como en leche cruda, y para la cepa M294bVO (no-O157:H7) en leche cruda, el almacenamiento a 6°C no permitió su crecimiento.

3. COMPORTAMIENTO DE CEPAS STEC EN QUESO TIPO ZAMORANO

Los resultados obtenidos para los parámetros físico-químicos y microbiológicos a lo largo del proceso de elaboración de quesos tipo Zamorano con leche cruda de ovino se presentan en la Tabla IV.2.

El proceso de elaboración y maduración de los quesos fue bastante homogéneo entre las diferentes réplicas realizadas tal y como reflejan las desviaciones estándar de los valores obtenidas para los diferentes parámetros estudiados (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Evolución de diferentes parámetros físico-químicos y microbiológicos en el proceso de elaboración y maduración de queso tipo Zamorano fabricado con leche cruda de oveja inoculada con la cepa de *E. coli* O157:H7 M240VO.

FASE DE PRODUCCIÓN	pH	a _w	NaCl	BAL ^a (ufc/g)	Cepa M240VO (ufc/g)
Leche	^b 6,51 ± 0,01	1,000 ± 0,001	ND ^c	ND	2,79 ± 0,09 ^d
Cuajada	6,41 ± 0,01	0,996 ± 0,001	ND	8,17 ± 0,18	3,43 ± 0,21
Tras salado	5,41 ± 0,02	0,985 ± 0,003	1,73% ± 0,00	9,40 ± 0,06	3,72 ± 0,05
Tras escurrido	5,38 ± 0,03	0,980 ± 0,003	1,71% ± 0,00	9,38 ± 0,16	3,73 ± 0,05
24 h maduración	5,34 ± 0,01	0,976 ± 0,001	1,60% ± 0,00	9,36 ± 0,07	3,17 ± 0,26
1 semana maduración	5,35 ± 0,03	0,967 ± 0,002	1,67% ± 0,00	9,17 ± 0,09	2,95 ± 0,27
1 mes maduración	5,32 ± 0,01	0,962 ± 0,002	1,70% ± 0,00	9,34 ± 0,02	0,98 ± 0,32
2 meses maduración	5,30 ± 0,01	0,955 ± 0,001	1,94% ± 0,00	9,27 ± 0,10	0,80 ± 0,00

^a BAL, bacterias acidolácticas

^b Cada media ± desviación estándar representa el promedio de seis resultados.

^c ND: No determinado

^d Recuento de la cepa M240VO expresado en ufc/ml

Los valores de pH y a_w fueron disminuyendo a lo largo del proceso (hasta 5,34±0,01 y 0,976±0,001 a las 24 h de maduración, respectivamente), mientras que la concentración de sal experimentó pequeñas fluctuaciones (alrededor de ±0,13%) para finalmente aumentar hasta un valor de 1,94% de NaCl al final de la maduración. De hecho, se pudo observar que existía una correlación inversa (p < 0,05) de la concentración de sal con respecto al pH (r= -0,99) y a la a_w (r= -0,82). Estos resultados siguen la tendencia esperada en el proceso de elaboración y maduración de cualquier queso de oveja de este tipo.

Los recuentos de BAL aumentaron significativamente durante el prensado y salado de los quesos (+1,23 log ufc/g). A partir de este momento, su nivel se mantuvo bastante estable (Figura IV.6) hasta el final del proceso (9,27±0,10 log ufc/g).

Durante las primeras etapas de la elaboración de los quesos, los recuentos de la cepa M240VO de *E. coli* O157:H7 aumentaron desde una concentración inicial de 2,79±0,09 log ufc/ml hasta 3,73±0,05 log ufc/g después del escurrido, momento a partir del cual su nivel empezó a descender hasta el primer mes de maduración (0,98±0,32 log ufc/g), manteniéndose estos números sin diferencias significativas hasta el fin del estudio (Figura IV.6).

Se observó una correlación directa entre los recuentos de la cepa M240VO y la a_w , no existiendo correlación con el resto de parámetros fisicoquímicos o con los recuentos de BAL.

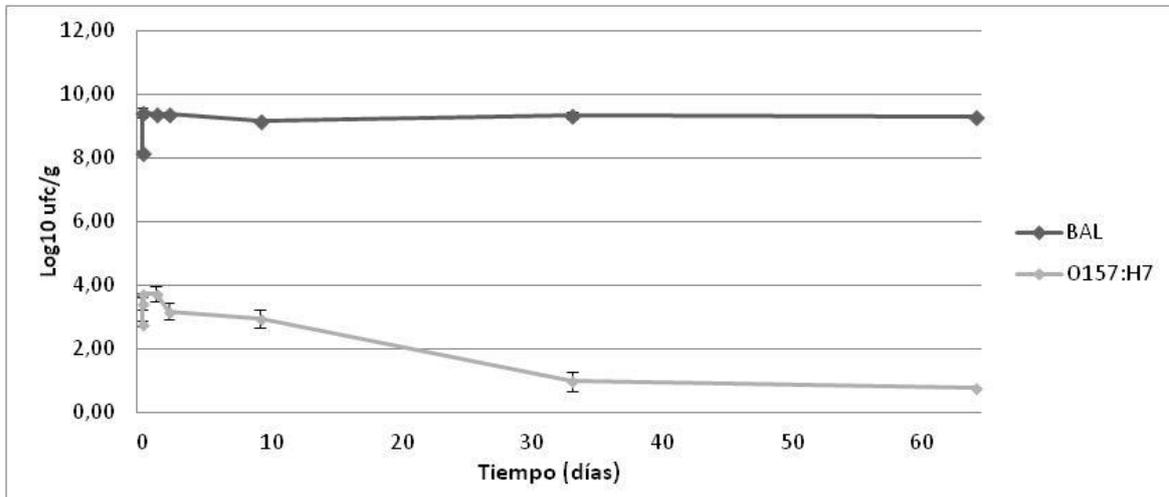


Figura IV.6. Evolución a lo largo del proceso de elaboración y maduración de quesos de leche cruda de ovino (tipo Zamorano) de los recuentos de BAL (bacterias acidolácticas) y *E. coli* O157:H7 (cepa M240VO).

DISCUSIÓN

La presencia de cepas STEC en leche y productos lácteos, tanto de ovino como de otras especies ha sido detectada frecuentemente. Así, se han publicado numerosos trabajos en los que se han aislado estas cepas tanto de leche (Dontorou et al., 2003; Muehlherr et al., 2003; Caro et al., 2006; Rey et al., 2006; D'Amico et al., 2008; Solomakos et al., 2009; Martin & Beutin, 2011) como de diversas variedades de quesos (Vernozy-Rozand et al., 2005; Holko et al., 2006; Rey et al., 2006; Caro & García-Armesto, 2007; Mora et al., 2007; Martin & Beutin, 2011; Elhadidy & Mohammed, 2012; Farrokh et al., 2013). Estos hallazgos y algunos datos epidemiológicos ponen de manifiesto el posible riesgo asociado a la presencia de STEC en quesos y otros productos lácteos elaborados con leche cruda (Baylis, 2009; Farrokh et al., 2013).

La importancia de las cepas STEC como agentes de enfermedades de transmisión alimentaria es indudable. Además de sus factores de virulencia y el hecho de que los animales lecheros portadores no presenten síntomas clínicos, destaca su baja dosis infectiva (entre 10 y 100 células) y su resistencia a la acidez (Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011). Durante la elaboración de muchas variedades de quesos, el pH desciende aproximadamente desde 6,7 a 5,2 debido a la actividad metabólica de las BAL, aunque en algunos tipos este descenso puede ser mayor, como en los quesos de coagulación ácida o en el Camembert que pueden llegar hasta 4,3 y 4,6 respectivamente (Peng et al., 2011). *E. coli* O157:H7 se multiplica en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 9 pero algunas cepas lo hacen a pH tan bajos como 2 ó 3 (Welch, 2006; Farrokh et al., 2013). Creemos que todo lo expuesto, justifica la primera parte de este estudio ya que se pretendía seleccionar las cepas más resistentes a la acidez para observar su comportamiento durante la fabricación del queso tipo Zamorano.

En las pruebas de comportamiento de cepas STEC en leche cruda y pasteurizada (LHT) mantenidas a diferentes temperaturas se observaron diferencias significativas en función de si la leche había sido o no tratada térmicamente. En general, los recuentos al final del almacenamiento fueron significativamente mayores en la leche LHT que en la leche cruda. Estos resultados eran esperables teniendo en cuenta el efecto que los microorganismos presentes de forma natural en la leche pueden ejercer sobre las

bacterias patógenas. En varios trabajos, Nero et al. (2008; 2009) estudiaron el efecto que la población microbiana propia de la leche (principalmente BAL) ejercía sobre patógenos tales como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., apreciándose una inhibición total o parcial del crecimiento de estas bacterias. Además, el estudio realizado por Marek et al. (2004) en suero pasterizado y no pasterizado reveló que las BAL presentes en el suero no pasterizado ejercían un efecto inhibitorio sobre *E. coli* O157:H7.

Cuando se compara el efecto de las temperaturas de almacenamiento ensayadas en este trabajo; en general, a 6°C se apreció un descenso significativo ($p < 0,05$) de los recuentos que oscilaba entre una y dos unidades logarítmicas (excepto en la muestra de leche pasterizada inoculada con la cepa no-O157:H7). Sin embargo, a 8°C y 10 °C se observaron aumentos de las poblaciones de alrededor de una unidad logarítmica (excepto para la muestra de leche cruda inoculada con la cepa no-O157:H7 e incubada a 8 °C). Durante la simulación de fallo en la cadena de frío se observó que, en leche LHT, los niveles de ambas cepas aumentaban significativamente mientras que en leche cruda disminuían.

Mamani et al. (2003) mantuvieron a 4°C y 20°C muestras de diferentes tipos de leche UHT inoculadas con una mezcla de dos cepas de *E. coli* O157:H7 y también con cepas no patógenas de esta especie. En las primeras 24 h, las cepas patógenas crecieron en leche entera a 4 °C y en todas las demás a 20 °C. Wang et al. (1997) estudiaron el comportamiento de una mezcla de cinco cepas de *E. coli* O157:H7 en leche pasterizada y no pasterizada, observando que a 5°C no crecían y que la población descendía en 1,5-2 log ufc/ml tras 28 días de almacenamiento tanto en la leche tratada como en la cruda. A 8°C, los recuentos aumentaron entre 1 y 2 log ufc/ml en los cuatro primeros días y a 15°C lo hicieron entre 3 y 5 log ufc/ml a los tres días. A 22 °C, el pH de la leche descendió rápidamente, no detectándose células viables de *E. coli* O157:H7 a los 14 días. Palumbo et al. (1997) investigaron la evolución de cuatro cepas del serogrupo O157 inoculadas en muestras de leche UHT, pasterizada y cruda almacenadas a distintas temperaturas. En leche pasterizada mantenida a 8 y 12°C, en general, los recuentos aumentaron y, en el caso de la leche cruda, éstos se mantuvieron estables tanto a 8°C como a 12°C. Los datos obtenidos en estos trabajos

y los hallados por nosotros sugieren: a) que el almacenamiento de la leche a temperaturas ≤ 6 °C permiten, al menos, la supervivencia de células viables de *E. coli* O157:H7, b) que temperaturas de entre 8-20 °C pueden permitir la multiplicación de estas cepas y, c) que la flora presente en la leche cruda suele inhibir el crecimiento de estas bacterias pero no garantizar su ausencia. Para cepas no-O157:H7 no hemos encontrado datos pero, en nuestro caso, la cepa objeto del estudio, creció significativamente en leche pasteurizada mantenida a bajas temperaturas pero no lo hizo en leche cruda aunque siempre se detectaron células viables. Esto indica que la leche contaminada con cepas STEC y mantenida a las temperaturas exigidas por la normativa de la UE (Anónimo, 2004) puede suponer un riesgo si se destina a la fabricación de productos lácteos no tratados térmicamente. Finalmente, hay que señalar que aunque las cepas de *E. coli* O157:H7 son bacterias mesófilas y, por tanto, teóricamente, incapaces de multiplicarse a temperaturas inferiores a 7 °C, existen algunas cepas que parecen poseer mecanismos genéticos especiales que permiten su supervivencia y multiplicación a bajas temperaturas (Vidovic et al., 2011).

Los datos publicados acerca del comportamiento de bacterias patógenas durante la elaboración y maduración del queso varían en función de la tecnología necesaria para su obtención (variedad o tipo de queso que se asocia a: pH, a_w , contenido en NaCl, etc.), influyendo, además, las características de la cepa ensayada y los métodos analíticos empleados (Peng et al., 2011). Es evidente, por tanto, que resulta difícil comparar los estudios del comportamiento de STEC ya que tanto los tipos de queso estudiados como la metodología varían aunque, habitualmente, se aprecia que los recuentos de STEC aumentan durante las primeras fases de la fabricación y disminuyen durante la maduración (Peng et al., 2011; Farrokh et al., 2013). Esto se ha observado durante la fabricación de quesos de vena azul y de otras variedades como Cheddar, Camembert, Feta, etc. (Maher et al., 2001; Govaris et al., 2002; Schlessler et al., 2006; Montet et al., 2009; Mischczycha et al., 2013).

Al inicio del proceso de fabricación, la temperatura y la a_w de la leche son adecuadas para el crecimiento de STEC. Cuando se coagula la leche, se produce un aumento de los recuentos de STEC debido, en parte, a que las células bacterianas quedan atrapadas en la cuajada (se estima un incremento de 10 veces) aunque

también pueden haberse multiplicado (Farrokh et al., 2013). Durante la maduración, los niveles disminuyen significativamente aunque la tasa de inactivación varía, entre otras cosas, en función del tipo de queso y de la cepa. Así, Maher et al. (2001) observaron que una cepa de *E. coli* O157:H7, inoculada en la leche destinada a la elaboración de un queso madurado superficialmente, pasaba durante las primeras 24 horas desde $1,52 \pm 0,03$ log ufc/ml hasta $3,4 \pm 0,05$ log ufc/g. A los 21 días de maduración, los niveles eran inferiores a 1 ufc/g en la superficie y 10 ufc/g en el interior del queso aunque utilizando una técnica de enriquecimiento, se detectaron células viables hasta después de 90 días. En otro trabajo realizado con quesos Feta y Teleme, Govaris et al. (2002), observaron que *E. coli* O157:H7 (una mezcla de dos cepas) era indetectable después de 30-44 días de maduración, dependiendo de la variedad del queso y del cultivo iniciador utilizado (termofílico o mesofílico). En la exhaustiva revisión de Farrokh et al. (2013), la mayoría de los estudios coinciden en el descenso de los niveles de esta bacteria aunque, en muchas ocasiones, se detectan células viables tras un almacenamiento prolongado. Una excepción es el trabajo de Ramsaran et al. (1998) que, en quesos Feta y Camembert, observaron niveles de *E. coli* O157:H7 más altos en producto final (dos unidades logarítmicas) que al inicio del proceso. Estos últimos datos resultan, cuanto menos llamativos ya que se almacenaron a bajas temperaturas ($2 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 75 días.

En conjunto, nuestros resultados coinciden con los hallados en los trabajos citados. Por lo que respecta a los parámetros fisicoquímicos y a los niveles de BAL, siguieron el patrón esperable durante la elaboración y maduración de un queso tipo Zamorano. Los recuentos de la cepa de *E. coli* O157:H7 aumentaron una unidad logarítmica durante el proceso de elaboración del queso, disminuyendo posteriormente hasta llegar a unos recuentos finales de 6,25 ufc/g a los dos meses de maduración. Entre los estudios consultados, el de Govaris et al. (2002) es el que más se asemeja al nuestro tanto en la evolución de los parámetros físico químicos como en la evolución de las bacterias en las fases iniciales del proceso pero, al final del periodo de maduración, estos autores no detectan células viables a pesar del elevado inóculo inicial ($5,6$ log ufc/ml).

Como ya se ha señalado previamente, a los dos meses de maduración, los recuentos finales de nuestra cepa de *E. coli* O157:H7 inoculada en leche de oveja destinada a la fabricación de queso tipo Zamorano fueron de 6,25 ufc/g. No es fácil conocer la cantidad de queso tipo Zamorano consumida por un individuo pero en las grandes superficies se comercializan cuñas de 250 g divididas en 21 porciones (11,9 g); esto significaría 74,4 ufc de *E. coli* O157:H7 por porción y, es muy probable, que se consuman cantidades mayores. Por tanto, los niveles de esta bacteria se encontrarían en o superarían el rango de la dosis infectiva mínima y, esto significa que la leche destinada a la elaboración de quesos tipo Zamorano conteniendo niveles altos de *E. coli* O157:H7 puede representar un riesgo para el consumidor. Esta conclusión habría que matizarla teniendo en cuenta que no es muy probable que la leche de oveja contenga *ca.* 3 log ufc/ml de *E. coli* O157:H7; aunque este nivel de inóculo se eligió teniendo en cuenta el “peor escenario posible” en carne picada y en leche (ICMSF, 2002; Schlessler et al., 2006). Por otro lado, también hay que considerar que, en algunos estudios, se ha demostrado que *E. coli* O157:H7 se encuentra en el queso en el interior de la matriz proteica individualmente pero también en pequeños grupos de unas 10 células y, por tanto, los recuentos bajos deberían ser interpretados con cautela ya que una sola colonia podría no corresponder a una única célula (Erickson & Doyle, 2007; Baylis, 2009).

Finalmente, hay que señalar que en el Reglamento 209/2013 (Anónimo, 2013) en el que se establecen criterios microbiológicos para semillas germinadas (brotes), que son productos listos para el consumo, se incluyen cepas STEC de los serogrupos y serotipos O157, O26, O111, O103, O145 y O104:H4. Para los brotes, deben analizarse cinco muestras de 25 g (n=5) y ninguna de ellas (c=0) puede contener estas STEC (m=0). La toma de muestras se realizará durante la comercialización y si no cumplen el criterio se deberán retirar del mercado.

En resumen: 1) las cepas de STEC presentan diferente resistencia a la acidez, 2) en leche de oveja, los niveles de las cepas STEC O157 y no-O157 disminuyen, se mantienen o aumentan a las temperaturas de almacenamiento exigidas por la normativa vigente en la UE, siendo, como era de esperar, más favorable para su supervivencia y desarrollo la leche tratada térmicamente y 3) aunque los niveles de

Capítulo IV. Discusión

STEC O157 disminuyen durante la maduración, los quesos tipo Zamorano elaborados con leche cruda con una concentración inicial de *E. coli* O157:H7 de *ca.* 3 log ufc/ml podrían suponer un riesgo para el consumidor dependiendo de la cantidad de queso consumido.

BIBLOGRAFÍA

1. Anónimo. 2013. Reglamento (UE) Nº 209/2013 de la Comisión de 11 de marzo de 2013 que modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 en lo que respecta a los criterios microbiológicos para los brotes y las normas de muestro para las canales de aves de corral y la carne fresca de aves de corral. D. O., L 68: 19-23.
2. Anónimo. 2006. Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios. BOE, Nº 126: 19999-20002.
3. Anónimo. 2004. Reglamento (CE) Nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. D. O., L 139: 55.
4. Anónimo. 1993. ORDEN de 6 de mayo de 1993 por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen "Queso Zamorano" y su Consejo Regulador. BOE, Nº 120: 15311-15316.
5. Baylis, C. L. 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Int. J. Dairy Technol., 62: 293-307.
6. Bradley, R. L. 2006. Capítulo 33. Dairy Products. AOAC Official Method 935.43. Chloride (Total) in Cheese. Volhard Method. In: Horwitz, W. and Latimer, G. W. (Eds.), Official Methods of Analysis. AOAC International, USA, pp. 71.

7. Caro, I. & García-Armesto, M. R. 2007. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 116: 410-413.
8. Caro, I., Fernández-Barata, V. M., Alonso-Llamazares, A. and García-Armesto, M. R. 2006. Detection, occurrence, and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from raw ewe's milk in Spain. *J. Food Prot.*, 69: 920-924.
9. D'Amico, D. J., Groves, E. and Donnelly, C. W. 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J. Food Prot.*, 71: 1580-1589.
10. Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., Salamoura, A., Kansouzidou, A. and Levidiotou, S. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from foods in Greece. *Int. J. Food Microbiol.*, 82: 273-279.
11. Elhadidy, M. & Mohammed, M. A. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk cheese in Egypt: prevalence, molecular characterization and survival to stress conditions. *Lett. Appl. Microbiol.*, 56: 120-127.
12. Elizaquível, P., Sánchez, G. and Aznar, R. 2011. *Escherichia*. In: Liu, D. (Ed.), *Molecular detection of human bacterial pathogens*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 869-879.
13. Erickson, M. C. & Doyle, M. P. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, 70: 2426-2449.

Capítulo IV. Bibliografía

14. Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K. and Govaris, A. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.*, 162 (2): 190-212.
15. Govaris, A., Papageorgiou, D. K. and Papatheodorou, K. 2002. Behavior of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and ripening of feta and telemes cheeses. *J. Food Prot.*, 65: 609-615.
16. Holko, I., Bisova, T., Holkova, Z. and 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.
17. ICMSF. 2002. *Microorganisms in foods: 7. Microbiological testing in food safety management*. Kluwer Academic / Plenum publishers. New York.
18. Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A. 2005. Chapter 27, Foodborne gastroenteritis caused by *Escherichia coli*. In: Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A. (Eds.), *Modern food microbiology*. Springer Verlag.
19. Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123-140.
20. Maher, M. M., Jordan, K. N., Upton, M. E. and 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.

Capítulo IV. Bibliografía

21. Mamani, Y., Quinto, E. J., Simal-Gandara, J. and Mora, M. T. 2003. Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 in different types of milk stored at 4 °C or 20 °C. J. Food Sci., 68: 2558-2563.
22. Marek, P., Nair, M. K. M. and Venkitanarayanan, K. 2004. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157: H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey. Int. J. Food Microbiol., 94: 1-7.
23. 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.
24. Miszczucha, S. D., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus-Aziza, F., Montel, M. C. and 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.
25. Montet, M. P., Jamet, E., Ganet, S., Dizin, M., Miszczucha, S., Dunière, L., Thevenot, D. and Vernozy-Rozand, C. 2009. Growth and survival of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains during the manufacture and ripening of camembert cheese. Int. J. Microbiol., 2009.
26. Mora, A., León, S. L., Blanco, M., Blanco, J. E., López, C., Dahbi, G., Echeita, A., González, E. A. and Blanco, J. 2007. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). Int. J. Food Microbiol., 114: 204-210.

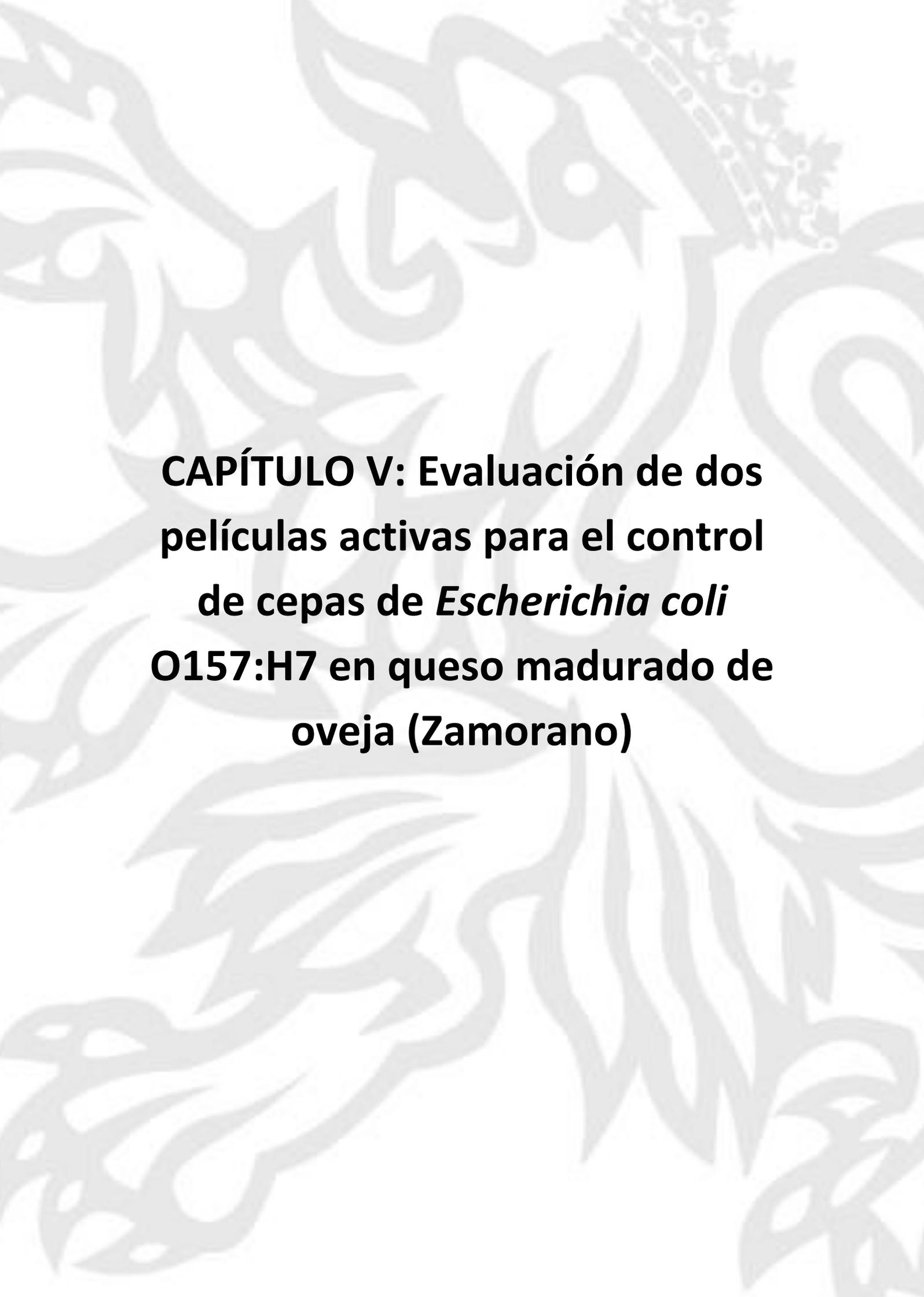
Capítulo IV. Bibliografía

27. Muehlherr, J. E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J. E. and Stephan, R. 2003. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. Dairy Sci.*, 86: 3849-3856.
28. Nero, L. A., De Mattos, M. R., de Aguiar Ferreira Barros, M., Ortolani, M. B. T., Beloti, V. and de Melo Franco, B. D. G. 2008. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses and Public Health*, 55: 299-305.
29. Nero, L., Mattos, M., Beloti, V., Barros, M., Ortolani, M. and Franco, B. 2009. Autochthonous microbiota of raw milk with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *J. Food Saf.*, 29: 261-270.
30. Palumbo, S. A., Pickard, A. and Call, J. E. 1997. Population changes and verotoxin production of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains inoculated in milk and ground beef held at low temperatures. *J. Food Prot.*, 60: 746-750.
31. Peng, S., Tasara, T., Hummerjohann, J. and 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.
32. Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A. and Griffiths, M. W. 1998. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in soft cheeses. *J. Dairy Sci.*, 81: 1810-1817.

33. Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J. E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R. and Alonso, J. M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int. J. Food Microbiol.*, 107: 212-217.
34. Schlessler, J. E., Gerdes, R., Ravishankar, S., Madsen, K., Mowbray, J. and Teo, A. Y. L. 2006. Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157: H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk. *J. Food Prot.*, 69: 990-998.
35. Solomakos, N., Govaris, A., Angelidis, A. S., Pournaras, S., Burriel, A. R., Kritas, S. K. and 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.
36. Vernozy-Rozand, C., Montet, M. P., Berardin, M., Bavai, C. and Beutin, L. 2005. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Lett. Appl. Microbiol.*, 41: 235-241.
37. Vidovic, S., Mangalappalli-Illathu, A. K. and Korber, D. R. 2011. Prolonged cold stress response of *Escherichia coli* O157 and the role of *rpoS*. *Int. J. Food Microbiol.*, 146: 163-169.
38. Wang, G., Zhao, T. and Doyle, M. P. 1997. Survival and growth of *Escherichia coli* O157: H7 in unpasteurized and pasteurized milk. *J. Food Prot.*, 60: 610-613.

Capítulo IV. Bibliografía

39. Welch, R. A. 2006. The Genus *Escherichia*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. and Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma subclass*. Springer, Singapore, pp. 60-71.



CAPÍTULO V: Evaluación de dos películas activas para el control de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 en queso madurado de oveja (Zamorano)

INTRODUCCIÓN

Basándose en sus factores de virulencia, las cepas de *E. coli* patógenas para el hombre se clasifican en seis grupos o “patotipos”. Uno de ellos es el denominado enterohemorrágico (EHEC) que, a su vez, pertenece a un grupo de cepas productoras de toxinas Shiga (STEC) también denominadas cepas de *E. coli* productoras de verotoxinas (VTEC) (Nataro & Kaper, 1998). A varios serogrupos y serotipos de STEC se les reconoce como enterohemorrágicos y pueden causar graves enfermedades humanas de transmisión alimentaria, destacando entre ellos *E. coli* O157:H7. Estas bacterias se caracterizan por su baja dosis infectiva (entre 10 y 100 células) y por su capacidad para producir diarrea y colitis hemorrágica. Estos procesos pueden progresar a cuadros más severos como el síndrome urémico hemolítico (SUH) que puede llegar a ser fatal, especialmente en niños y ancianos. Así, el SUH es la principal causa de fallo renal en los más jóvenes y puede ocasionar una elevada morbilidad e incluso la muerte en personas mayores (Meng et al., 2013).

El principal reservorio de este patógeno son los rumiantes domésticos y silvestres (Ferens & Hovde, 2011) y los alimentos involucrados más frecuentemente son las hamburguesas insuficientemente cocinadas y otros productos cárnicos así como agua no higienizada, frutas y verduras y quesos elaborados con leche cruda (Espíe et al., 2006; Farrokh et al., 2013). La incidencia de *E. coli* O157:H7 y otros EHEC en quesos elaborados con leche de oveja y en leche cruda de oveja destinada a la fabricación de queso ha sido investigada en varios países (Rey et al., 2006; Caro & García-Armesto, 2007; Caro et al., 2011; Farrokh et al., 2013).

La explotación del ganado ovino es una actividad muy importante en España (ca. 22% de la UE) y se concentra principalmente en algunas Comunidades Autónomas como Castilla y León que, según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://www.magrama.gob.es>), es la primera Comunidad productora de leche de oveja (70% de la producción nacional). La mayor parte de la leche producida se dedica (sin previo tratamiento térmico) a la elaboración de queso, siendo uno de los más consumidos la variedad de queso Zamorano.

Los principios del envasado activo han sido revisados en la “Introducción General”. El envasado activo ha sido definido como un envase que proporciona ventajas añadidas a las del envasado a vacío y en atmósfera modificada (Rooney, 2005) y de acuerdo con la normativa (Reglamento (CE) nº 450/2009) (Anónimo, 2009), “*los materiales y objetos activos son los destinados a prolongar la vida útil o a mantener o mejorar el estado del alimento envasado. Están diseñados para incorporar intencionadamente componentes que liberarán sustancias en el alimento envasado o en su entorno o absorberán sustancias del alimento o de su entorno*”.

El envasado antimicrobiano es una forma de envasado activo. La utilización de envases activos conteniendo compuestos antimicrobianos beneficia tanto al consumidor como a la industria alimentaria ya que puede incrementar la vida útil de los alimentos y/o mantener la inocuidad de éstos bien inactivando los microorganismos diana o reduciendo su tasa de crecimiento. Se han propuesto numerosos compuestos para ser incorporados al material de envasado (Suppakul et al., 2003; Cha & Chinnan, 2004); algunos de ellos son ciertos productos químicos, “agentes naturales” y probióticos. Entre los propuestos y ensayados destacan el aceite esencial de orégano -*Origanum vulgare* L- (OR) y el Etil Lauroil Arginato (LAE) (Han, 2005).

Un número reducido de estudios presentan datos acerca del efecto de películas conteniendo OR y LAE frente a algunos serovares de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y cepas no patógenas de *E. coli* presentes en envases de ensalada (Muriel-Galet et al., 2012b), preparados para lactantes (Muriel-Galet et al., 2012a) y lonchas de jamón cocido (Theinsathid et al., 2012). Sin embargo, no existe información relativa al efecto de películas recubiertas con OR y LAE en el comportamiento de cepas pertenecientes al serotipo patógeno *E. coli* O157:H7.

OBJETIVO

El trabajo recogido en este capítulo se diseñó para evaluar la actividad frente a *E. coli* O157:H7 de dos películas distintas recubiertas con diferentes concentraciones de OR y LAE. Los ensayos se realizaron mediante estudios *in vitro* y también por contacto directo con muestras inoculadas de queso Zamorano. Asimismo, se evaluó el efecto de estos envases en la calidad organoléptica del queso.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS

Se emplearon dos cepas de *E. coli* O157:H7. Una de ellas fue la cepa CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) 5947 y, la otra, la cepa STEC M364VO aislada por nosotros de leche de tanque en una explotación de ganado ovino. La segunda cepa poseía los genes *stx2* y *eae*.

Ambas cepas se mantuvieron a -18 °C en Nutrient Broth (NB, Scharlab, Barcelona, España) con 40% de glicerol. Para los ensayos, las cepas se incubaron previamente en Tryptone Soya Broth (TSB, Scharlab) durante 18 horas a 37 °C.

2. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS

El aceite esencial de orégano había sido obtenido de *Origanum vulgare* L (Chemical Abstracts Service (CAS) número de registro 8007-11-2) y suministrado por Argolide Química SL (Barcelona, España). El LAE (CAS número de registro 60372-77-2) fue suministrado por Lamirsa (Barcelona, España).

3. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

3.1. Pruebas de dilución en caldo

Tanto para OR como para LAE, la concentración mínima inhibidora (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se determinaron empleando una técnica de dilución en caldo (Becerril et al., 2007).

OR: Utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España), se realizaron diluciones de factor dos en el rango 2,5-160 mg/ml (Sacchetti et al., 2005). Seguidamente, alícuotas de 10µl de cada dilución de OR se mezclaron con 890 µl de TSB conteniendo 0,6% de extracto de levadura (TSBYE, Scharlab) y se inocularon con 100 µl de una suspensión bacteriana en TSBYE (Scharlab) conteniendo 10⁶ ufc/ml. Las concentraciones finales de OR en la prueba oscilaban entre 0,025 y 1,6 mg/ml. Como control, para evaluar si el DMSO (Sigma-Aldrich Química) inhibía a las

dos cepas objeto del ensayo, se utilizaron 10 µl de este compuesto en lugar de las diluciones de OR.

En todos los casos, los cultivos se incubaron con agitación durante 24 horas a 37 °C. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la densidad óptica a 625 nm. Además, se tomaron muestras de 100 µl que se diluyeron (factor 10), se sembraron en placas de Tryptone Soya Agar (TSA, Scharlab) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Con cada cepa, el ensayo se realizó tres veces.

LAE: Utilizando agua destilada estéril, se realizaron diluciones de factor dos en el rango 1,25-160 mg/ml y el ensayo se realizó como para el OR, estando las concentraciones finales entre 0,0125 y 1,6 mg/ml. Se procedió del mismo modo que en el ensayo con OR, aunque en esta prueba los cultivos se incubaron sin agitación. Como en el caso anterior, con cada cepa, el ensayo se realizó tres veces.

La CMI se definió como la menor concentración del compuesto antimicrobiano en la que no se detectó crecimiento de las bacterias. La CMB se definió como la menor concentración del compuesto antimicrobiano en la que las cepas ensayadas no crecían en TSBYE (Scharlab) y tampoco en las placas de TSA (Scharlab).

3.2. Actividad antimicrobiana de láminas tratadas con OR y LAE

Para estos ensayos se utilizaron dos tipos de láminas: Polipropileno (PP) y Polietilentereftalato (PET). El PET presentaba 23 µm de espesor con una densidad de $18,73 \pm 0,02 \text{ g/m}^2$, mientras que el PP tenía 40 µm de espesor. En ambos casos, se recubrieron con formulaciones conteniendo los agentes antimicrobianos mediante un proceso protegido por la patente europea EP1657181 (Nerín & Garcés, 2006). Las películas activas contenían la sustancia activa expresada como un porcentaje de peso de agente activo/peso de la capa activa húmeda. La cantidad de barniz añadida a las láminas fue de 4 g/m^2 en todos los casos.

En el caso del OR se estudió su acción en fase de vapor y por contacto directo mientras que en el caso del LAE únicamente se comprobó su acción por contacto directo ya que este compuesto no es activo en fase de vapor.

3.2.1. Actividad antimicrobiana en fase vapor

Se investigó la acción antimicrobiana del OR incorporado en el material de envasado frente a las dos cepas de *E. coli* utilizando los dos tipos de láminas.

Las películas con actividad antimicrobiana, que fueron producidas por Artibal (Sabiñánigo, Huesca, España), tenían incorporadas diferentes concentraciones de OR (4, 6 y 8%). Las formulaciones de OR se prepararon utilizando como solvente un barniz (ATOX) también desarrollado por Artibal.

Para realizar el ensayo, se sembraron, en superficie, placas de TSA (Scharlab) con 100 µl de TSBYE (Scharlab) conteniendo 10^6 ufc/ml de cada cepa. Las tapas de las placas se sustituyeron por las películas tratadas sujetándolas a la base con una brida (López et al., 2007b). Los controles se prepararon de forma idéntica pero las películas estaban recubiertas con el barniz sin incorporar OR. Transcurrido el período de incubación (24 h a 37 °C), se comparó el crecimiento de las cepas en las placas cubiertas con películas activas con el de las placas control, estableciéndose las categorías siguientes: -, sin inhibición; +, inhibición parcial y ++, inhibición total. Cada ensayo se realizó por triplicado.

3.2.2. Actividad antimicrobiana por contacto directo

OR: Se estudió la acción antibacteriana del OR por contacto directo frente a las dos cepas de *E. coli* utilizando los dos tipos de lámina. El protocolo seguido está recogido en la norma “Japanese Industrial Standard method JIS Z 2801:2000” (Anónimo, 2000).

De forma resumida, trocitos cuadrados (50x50 mm) de PP y PET tratados con 4, 6 y 8 % OR se colocaron, con la superficie activa hacia arriba, en placas de Petri vacías. Sobre estos cuadrados (tres por cada concentración de OR) se depositaban 400 µl de TSBYE (Scharlab) conteniendo 10^5 ufc/ml de la cepa a ensayar, cubriéndose finalmente con otros tantos cuadrados (40x40 mm) de la misma película sin tratar (recubierta sólo con ATOX). Este mismo proceso se llevó a cabo con tres láminas de PP y tres de PET recubiertas únicamente con ATOX, sin OR. Todas las láminas conteniendo OR, después de incubarse a 37 °C durante 24h, se introdujeron en una bolsa de “stomacher”, y se

“lavarón” con 10 ml de agua de peptona. Se realizaron diluciones de esta suspensión, sembrando 100 µl en la superficie de TSA (Scharlab). Tras la incubación de las placas (24h a 37 °C) se contaron las colonias. El mismo protocolo de lavado, diluciones, siembra y recuento se llevó a cabo con las películas sin OR inmediatamente después de inocular y tras 24h de incubación.

La actividad antimicrobiana se expresó como valor R. Este valor se calculó utilizando la fórmula $R = \log(B/C)$, siendo B la media de los recuentos de las películas sin tratar (momento 0) y C la media de los recuentos de las películas tratadas (tras 24h de incubación).

LAE: Se utilizaron láminas de PP y PET tratadas con tres concentraciones de LAE (4, 6 y 8%). Las formulaciones se prepararon utilizando como solvente un barniz (ACRIL), también diseñado por Artibal.

Para determinar la actividad antimicrobiana del LAE por contacto directo, no se pudo utilizar el método recogido en la norma japonesa (“Japanese Industrial Standard method JIS Z 2801:2000”) ya que las suspensiones bacterianas no se fijaban bien a la lámina y los resultados, por tanto, no eran fiables.

Se empleó una técnica de difusión en agar en la forma descrita por Iseppi et al. (2008). Trocitos cuadrados (40x40 mm) de PP y PET tratados con LAE se colocaron en la superficie de placas de TSA (Scharlab) que previamente habían sido inoculadas con un cultivo de las cepas crecidas durante 18h a 37 °C en TSBYE (Scharlab) (ca. 10^8 ufc/ml). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La actividad antibacteriana se cuantificó midiendo el halo de inhibición alrededor de la lámina. Como controles se utilizaron láminas de PP y PET recubiertas únicamente con el barniz ACRIL.

4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN QUESO ZAMORANO

Para comprobar el efecto de los envases activos (PP y PET recubiertos de OR y LAE) sobre las cepas de *E. coli* O157:H7 inoculadas en un alimento, se utilizó queso Zamorano. Esta es una variedad de queso madurado elaborado con leche cruda de oveja de las razas Churra y/o Castellana. Hay que recordar que la cepa STEC M364VO

había sido aislada de una explotación cuya producción se destinaba a la fabricación de queso de esta variedad.

Se adquirieron cuñas ya loncheadas de queso Zamorano preparadas para un consumo doméstico estimado de una semana. La superficie de las lonchas se inoculó sumergiéndolas en un cultivo de las cepas en TSBYE (Scharlab) conteniendo 10^6 ufc/ml, siendo la concentración final en las lonchas de *ca.* 10^4 ufc/g.

Lonchas sin contaminar (controles) y las lonchas contaminadas se colocaron en contacto directo con láminas de PP y PET recubiertas sólo de los barnices (ATOX y ACRIL) y de tres concentraciones (4, 6 y 8%) de cada compuesto antimicrobiano. Las lonchas así preparadas se envasaron en bolsas de PP normal y se almacenaron a 3 °C para simular condiciones domésticas de almacenamiento.

Se hicieron recuentos de *E. coli* O157:H7 inmediatamente después de la inoculación y tras un día y una semana de almacenamiento utilizando placas de Sorbitol MacConkey Agar (SMAC, Scharlab) incubadas a 37 °C durante 24h. Cada experimento se repitió seis veces.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS EN QUESO ZAMORANO

Los recuentos de *E. coli* O157:H7 obtenidos en el análisis microbiológico se transformaron y expresaron como \log_{10} ufc/g. Para cada parámetro, se calcularon las medias y desviaciones estándar. Se utilizó el análisis de regresión lineal para estudiar la relación entre los diferentes parámetros. Se analizó la posible influencia de la cepa, la lámina, los compuestos antimicrobianos y sus concentraciones y el tiempo de almacenamiento empleando un análisis de la varianza multifactorial (ANOVA).

Finalmente se llevó a cabo un análisis “post-hoc” mediante la prueba de Fisher de la mínima diferencia significativa (Fisher’s Least Significant Difference -LSD- test).

El análisis de todos los datos se llevó a cabo empleando el programa “Statistica for Windows” versión 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) (www.statsoft.com).

6. ANÁLISIS SENSORIAL

Se realizó el análisis sensorial de lonchas sin envasar y de lonchas (no contaminadas) del mismo queso Zamorano envasadas en contacto directo con las láminas (PP y PET) recubiertas con las diferentes concentraciones de OR y LAE. Los análisis se realizaron en cuatro días distintos, siendo su objetivo evaluar si los envases activos modificaban las características organolépticas del queso.

Se reclutó un panel de diez jueces cualificados a los que se pidió que ordenaran las muestras en orden decreciente de aceptabilidad general. Datos acerca del tipo de lámina, el antimicrobiano y su concentración y el tiempo de almacenamiento se presentan en las Tablas V.1. y V.2. Los datos se analizaron e interpretaron utilizando el test de Friedman de acuerdo con la Norma ISO 8587:2010 (Anónimo, 2010).

Tabla.V.1. Información relativa al análisis sensorial de láminas de queso Zamorano envasadas en películas recubiertas con diferentes concentraciones de OR.

Día de análisis	Nº de muestra	Lámina	% OR ^a	Tiempo de almacenamiento
Día 1	425	No lámina	0	No
	504	PP ^b	4%	24 horas
	216		6%	
	475		8%	
	812		4%	1 semana
	483		6%	
	514		8%	
Día 2	569		No plástico	0
	883	PET ^c	4%	24 horas
	153		6%	
	358		8%	
	149		4%	1 semana
	899		6%	
	987		8%	

^aOR, aceite esencial de orégano obtenido de *Origanum vulgare*

^bPP, Polipropileno

^cPET, Polietilentereftalato

Tabla V.2. Información relativa al análisis sensorial de láminas de queso Zamorano envasadas en películas recubiertas con diferentes concentraciones de LAE.

Día de análisis	Nº de muestra	Lámina	% LAE ^a	Tiempo de almacenamiento
Día 3	352	No lámina	0	No
	557	PP ^b	4%	24 horas
	877		6%	
	756		8%	
	747		4%	1 semana
	939		6%	
	285		8%	
Día 4	638		No plástico	0
	260	PET ^c	4%	24 horas
	548		6%	
	820		8%	
	727		4%	1 semana
	231		6%	
	518		8%	

^aLAE, Etil Lauroil Arginato

^bPP, Polipropileno

^cPET, Polietilentereftalato

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES CMI Y CMB FRENTE A *E. coli* O157:H7

Los valores CMI y CMB para ambas cepas de *E. coli* O157:H7 se presentan en la Tabla V.3.

Tabla V.3. CMI^a y CMB^b para dos cepas de *E. coli* O157:H7 en los ensayos de dilución en caldo.

ANTIMICROBIANO	CEPA	CMI (mg/l)	CMB (mg/l)
OR ^c	M364VO ^d	400	400
	CECT 5947 ^e	200	200
LAE ^f	M364VO	25	25
	CECT5947	25	25

^aConcentración mínima inhibidora

^bConcentración mínima bactericida

^cOR, aceite esencial de orégano obtenido de *Origanum vulgare*

^dCepa de origen ovino

^eCECT, Colección Española de Cultivos Tipo

^fLAE, Etil Lauroil Arginato

Como puede observarse, para cada compuesto, los valores CMB fueron idénticos a sus respectivas CMIs. El LAE mostró mayor actividad anti-*E. coli* que el OR y este último fue el doble de eficaz frente a la cepa patrón que frente a la cepa obtenida de leche de oveja. En un estudio llevado a cabo por Becerril et al. (2007) se determinaron los valores CMI y CMB del OR sobre una cepa patrón no patógena de *E. coli* (ATCC 25922). En este caso, los valores de CMI y CMB también resultaron idénticos, siendo de 190 mg/l, valor muy similar al obtenido en este trabajo para la cepa de colección (CECT 5947), mientras que la cepa de origen ovino (M364VO) resultó mucho más resistente. Otros investigadores obtuvieron resultados de CMI para el OR cercanos a los observados por nosotros para la cepa de origen ovino (Gutiérrez et al., 2008; Turgis et al., 2012). En el caso del LAE, se hallaron resultados idénticos en un estudio desarrollado por Becerril et al. (2013), y comparables a los publicados en otros trabajos (Muriel-Galet et al., 2012a; Higuera et al., 2013).

La elevada actividad antimicrobiana del LAE frente a las bacterias Gram-negativas se ha atribuido a alteraciones que afectan tanto a la membrana citoplasmática como a la membrana externa sin que tenga lugar la lisis celular (Rodríguez et al., 2004). Por lo que

respecta a los aceites esenciales de origen vegetal, se ha demostrado que el obtenido de *Origanum vulgare* presenta la mayor actividad bacteriostática y bactericida tanto para cepas verotoxigénicas como no verotoxigénicas de *E. coli* (Marino et al., 2001; Burt & Reinders, 2003).

2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN FASE VAPOR

La Tabla V.4 presenta el efecto inhibitor de la atmósfera generada por diferentes concentraciones de OR incorporadas en el material de envasado (PP y PET). La Figura V.1 ilustra el crecimiento de la cepa CECT 5947 en las placas cubiertas con las películas activas conteniendo tres concentraciones de OR.

Tabla V.4. Actividad antimicrobiana de la atmósfera generada por diferentes concentraciones de OR^a incorporadas a dos películas de envasado frente a dos cepas de *E. coli* O157:H7.

PELÍCULA	CONCENTRACIÓN	M364VO ^b	CECT ^c 5947
PP ^f	ATOX ^d (0%)	-	- ^e
	4%	-	-
	6%	+	+
	8%	++	++
PET ^g	ATOX (0%)	-	-
	4%	-	-
	6%	+	+
	8%	+	++

^aOR, aceite esencial de orégano obtenido de *Origanum vulgare*

^bCepa de origen ovino

^cCECT, Colección Española de Cultivos Tipo

^dBarniz sin OR

^e-, sin inhibición; +, inhibición parcial y ++, inhibición total

^fPP, polipropileno

^gPET, Polietilentereftalato

Ni el barniz ATOX ni el aceite esencial de orégano a concentraciones del 4% inhibieron el crecimiento de las cepas de *E. coli* O157:H7 pero si que lo hicieron concentraciones del 6% (inhibición parcial) y del 8% (inhibición total o parcial dependiendo de la película) (Tabla V. 4). Varios trabajos (Becerril et al., 2007; López et al., 2007a; Rodríguez et al., 2008; Gutiérrez et al., 2010) han demostrado que, en los ensayos de actividad antimicrobiana en fase de vapor, la actividad de los envases conteniendo aceites esenciales (EOs) es producida por los compuestos volátiles presentes en el espacio de

cabeza de la placa de Petri y por los compuestos activos que pasan al medio de cultivo. Para el OR, estos compuestos han sido identificados como agentes fenólicos tales como carvacrol y timol aunque otros compuestos minoritarios parece que ejercen un papel significativo (Burt, 2004; Gutiérrez et al., 2010).

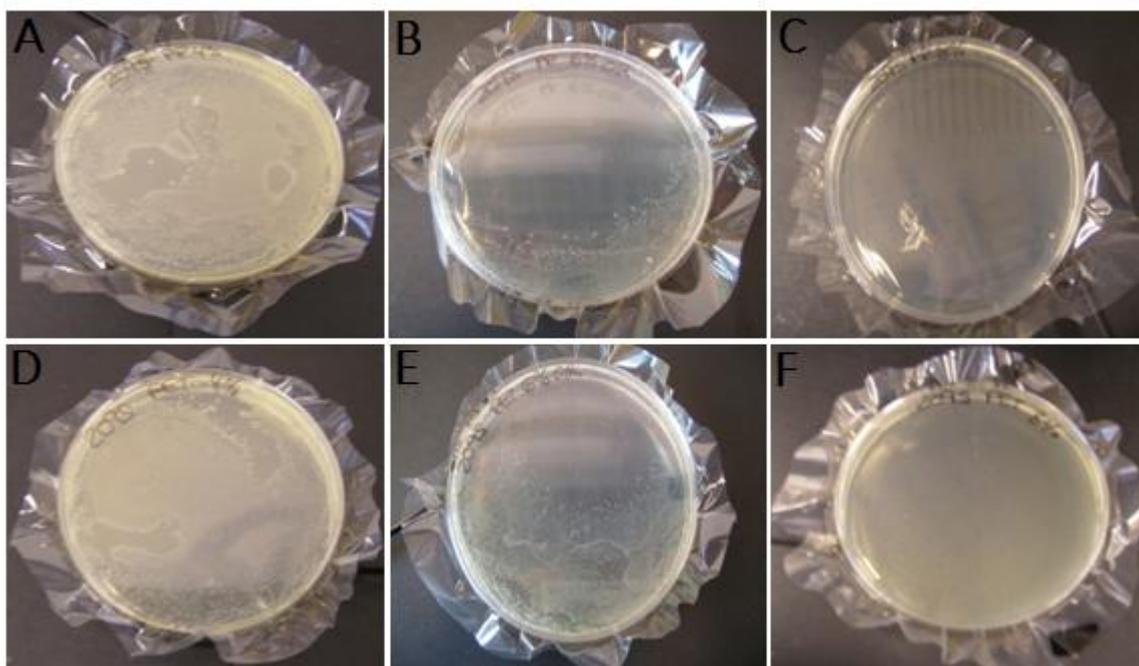


Figura V.1. Crecimiento de la cepa CECT 5947 sometida a la acción del OR en fase de vapor con los dos tipos de láminas recubiertas con OR al 4, 6 y 8%. Láminas de PP A, B y C: -, +, ++. Láminas de PET D, E y F: -, +, ++.

Los estudios, por métodos en fase de vapor, sobre los aceites esenciales incorporados en envases, ponen de manifiesto que la eficacia está relacionada con la concentración del compuesto activo, el material de envasado y el microorganismo diana (López et al., 2007a; Rodríguez et al., 2008; Gutiérrez et al., 2010). En este trabajo, al aumentar la concentración de OR en el envase activo, aumentaba la actividad antimicrobiana, siendo 6% OR, la mínima concentración que inhibía a ambas cepas. Al 8% OR, se observaron diferencias entre PP y PET. Así, la película 8% OR PP inhibía completamente a las dos cepas ensayadas mientras que la película 8% OR PET sólo inhibía completamente a la cepa de colección. Investigando *in vitro* el comportamiento de diferentes películas, Gutiérrez et al. (2010) concluyeron que, además de la concentración del compuesto activo, el polímero utilizado era un punto crítico en el diseño de los envases

activos porque la cinética de liberación de éstos desempeñaba un papel decisivo para alcanzar, en el medio, la concentración del compuesto activo que era necesaria para actuar sobre el microorganismo diana durante su fase de latencia y así inhibir su crecimiento. De hecho, una vez que el compuesto activo se incorpora al polímero pasa a formar parte de éste, ya que no es posible separarlo. Dependiendo de la polaridad del sustrato la liberación del compuesto activo será diferente. Es bien sabido que la capacidad de absorción y la difusión de los productos químicos en las láminas de PET son muy bajas, lo que significa que los compuestos activos incorporados como un revestimiento permanecen principalmente en su superficie. El PP posee una mayor capacidad de absorción que el PET y los compuestos activos se atrapan mejor en este sustrato, por esta razón resulta coherente que se encontraran mejores resultados con la lámina de PP que con la de PET para el OR en fase de vapor.

Por lo que respecta al microorganismo diana, parece que, en general, los aceites esenciales son más eficaces frente a los mohos y levaduras que frente a las bacterias y, entre éstas, las Gram-positivas son más sensibles (Burt, 2004). Además, se ha observado que, al menos, ciertos microorganismos influyen en la composición de la atmósfera creada por el aceite esencial. Esto se ha atribuido al efecto de diversas interacciones y/o rutas de biotransformación (López et al., 2007a).

3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR CONTACTO DIRECTO

3.1. OR

La actividad antimicrobiana del OR por contacto directo frente a las dos cepas, utilizando los dos tipos de láminas (PP y PET) se presenta en la Tabla V.5. El tratamiento de los resultados se llevó a cabo según la norma japonesa JIS Z 2801:2000 (Anónimo, 2000).

Para que este test se considere efectivo deben cumplirse tres requisitos. Los requisitos y el cumplimiento o no de éstos aparecen detallados a continuación:

- a) Se debe cumplir la siguiente fórmula para los recuentos de células viables inmediatamente después de la inoculación en los controles (ATOX).

$$(\text{Log}_{10 \text{ max}} - \text{Log}_{10 \text{ mín}}) / (\text{Log}_{10 \text{ mean}}) \leq 0,2$$

Donde,

$\text{Log}_{10 \text{ max}}$: logaritmo del máximo.

$\text{Log}_{10 \text{ min}}$: logaritmo del mínimo.

$\text{Log}_{10 \text{ mean}}$: logaritmo de la media.

Se aplicó la fórmula para cada una de las cepas y tipos de láminas en los controles inmediatamente después de la inoculación.

$$\text{CECT5947 / PP: } (\text{Log}_{10} 1,5 \times 10^5 - \text{Log}_{10} 1,2 \times 10^5) / (\text{Log}_{10} 1,33 \times 10^5) = 0,019 \leq 0,2$$

$$\text{CECT5947 / PET: } (\text{Log}_{10} 1,8 \times 10^5 - \text{Log}_{10} 1,3 \times 10^5) / (\text{Log}_{10} 1,57 \times 10^5) = 0,027 \leq 0,2$$

$$\text{M364VO / PP: } (\text{Log}_{10} 1,1 \times 10^5 - \text{Log}_{10} 9,8 \times 10^4) / (\text{Log}_{10} 1,02 \times 10^5) = 0,010 \leq 0,2$$

$$\text{M364VO / PET: } (\text{Log}_{10} 3 \times 10^5 - \text{Log}_{10} 1,1 \times 10^5) / (\text{Log}_{10} 1,9 \times 10^5) = 0,083 \leq 0,2$$

Como se puede observar, en todos los casos se cumplió el primero de los requisitos.

- b) El promedio de células viables inmediatamente después de la inoculación en los controles (ATOX) debe encontrarse entre 1 y 4×10^5 ufc/ml. Como se puede observar en la Tabla V.5, este requisito se cumplía, ya que estos promedios se encontraban entre $1,02$ y $1,9 \times 10^5$ ufc/ml.
- c) El número de células viables en los controles (ATOX) tras 24 horas de incubación no debe ser inferior a 1×10^4 ufc/ml en ninguna de las tres réplicas. Como puede verse en la Tabla V.5, este requisito también se cumplía en todos los casos, ya que estos recuentos oscilaban entre 1×10^4 a $1,8 \times 10^7$ ufc/ml.

A continuación se calculó el resultado de la actividad antimicrobiana (R) para las películas recubiertas con formulaciones de diferentes concentraciones de OR. Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{R} = \text{Log}_0 (\text{B} / \text{C})$$

El cálculo del valor R se indica en Material y Métodos y en el pie de la Tabla V.5.

Tabla V.5. Actividad antimicrobiana ensayada por un método de contacto directo^a de diferentes concentraciones de OR^b (4%, 6% y 8%) incorporadas en dos películas de envasado frente a dos cepas de *E. coli* O157:H7.

Cepa	Film	Concentración OR	Film control después de la inoculación (ufc/ml)	Film control a las 24 h (ufc/ml)	Films recubiertos a las 24 h (ufc/ml)	Valor R ^c
M364VO ^g	PP ^f	Barniz ATOX ^d	1,02 x 10 ^{5e}	5,40 x 10 ⁶		
		4%			1,40 x 10 ⁷	-0,41
		6%			9,20 x 10 ⁶	-0,23
		8%			4,47 x 10 ⁵	1,08
	PET ⁱ	Barniz ATOX	1,90 x 10 ⁵	7,00 x 10 ⁴		
		4%			SC ^h	
		6%			SC	
		8%			SC	
CECT ^j 5947	PP	Barniz ATOX	1,33 x 10 ⁵	1,50 x 10 ⁷		
		4%			9,43 x 10 ⁶	0,20
		6%			SC	
		8%			SC	
	PET	Barniz ATOX	1,57 x 10 ⁵	1,20 x 10 ⁵		
		4%			SC	
		6%			SC	
		8%			SC	

^aActividad ensayada utilizando la norma japonesa JIS Z 2801:2000

^bAceite esencial de orégano obtenido de *Origanum vulgare*

^cValor R calculado utilizando la fórmula $R = \log(B/C)$, siendo B la media de los recuentos de las películas sin tratar (momento 0) y C la media de los recuentos de las películas tratadas (tras 24h de incubación a 37 °C)

^dPelículas recubiertas sólo con el barniz (0% OR)

^eMedia de los recuentos obtenidos para tres muestras independientes

^fPP, Polipropileno

^gCepa aislada de leche de oveja

^hSC, sin crecimiento. No se recuperaron células viables de las películas activas tras 24 h de incubación a 37 °C

ⁱPET, Polietilentereftalato

^jCECT, Colección Española de Cultivos Tipo

La norma japonesa JIS Z 2801:2000 se desarrolló para medir la actividad antibacteriana de plásticos y de otros materiales no porosos tratados. En este estudio, tras 24 h de incubación a 37 °C, no se recuperaron células cultivables de las películas PET tratadas con 4, 6 y 8% de OR. Estos resultados ponen de manifiesto que, utilizando el método recogido en la norma japonesa, las películas PET recubiertas con OR mostraban, *in vitro*, una gran actividad antimicrobiana frente a las dos cepas de *E. coli* O157:H7 objeto del estudio. Las pruebas con las películas PP demostraron que recubiertas de 6 y 8% OR también inhibían completamente a la cepa de colección y que recubiertas con 4% OR

mostraban una inhibición del 38% (valor $R=0,20$). Sin embargo, para la cepa de origen ovino, la película PP recubierta de 4 y 6% OR no sólo no inhibían sino que permitían su crecimiento (valores R de $-0,41$ y $-0,23$) aunque las películas PP 8% OR produjeron una reducción del 91,7% (valor R de $1,08$).

Nuestros datos indican que utilizando el método JIS Z 2801:2000, las películas PET OR eran mucho más eficaces que las PP OR, dependiendo el comportamiento de esta última de la cepa objeto del estudio y también de la concentración del compuesto activo.

3.2. LAE

La Tabla V. 6 muestra la actividad antimicrobiana del LAE incorporado en el barniz ACRIL que recubría las películas PP y PET.

Las películas recubiertas con concentraciones 0 y 4% LAE no mostraron actividad antimicrobiana frente a ninguna de las cepas. La ausencia de actividad en las películas recubiertas sólo con el barniz ACRIL sugiere que, bajo las condiciones del ensayo (incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), las manipulaciones necesarias para preparar las películas sin LAE no afectaban a la actividad antibacteriana de las películas activas. La actividad anti-*E. coli* de las películas recubiertas con LAE, que se manifestaron por la inhibición del crecimiento debajo de la película y alrededor de ella (entre 1 y 2,5 mm), demuestran que las películas PET 6% LAE eran más eficaces que las películas PP 6% LAE aunque las películas 8% LAE PET y 8% LAE PP ocasionaron idénticos resultados (2,5 mm de zona de inhibición).

Como se observó en las pruebas anteriores, los resultados obtenidos con este método de contacto directo dependen del material de envasado y de la concentración del compuesto activo aunque no del microorganismo diana.

Tabla V.6. Efecto antimicrobiano ensayado por un método de contacto directo^a de diferentes concentraciones de LAE (4, 6 y 8%) incorporadas en dos películas de envasado frente a dos cepas de *E. coli* O157:H7.

Cepa	Película	Concentración LAE ^b	Zona de inhibición (mm) ^c
M364VO^f	PP^e	Barniz ACRIL ^d	0
		4%	0
		6%	1
		8%	2,5
	PET^g	Barniz ACRIL	0
		4%	0
		6%	1,5
		8%	2,5
CECT^h 5947	PP	Barniz ACRIL	0
		4%	0
		6%	1
		8%	2,5
	PET	Barniz ACRIL	0
		4%	0
		6%	1,5
		8%	2,5

^aActividad ensayada utilizando un método de difusión en agar descrito por Iseppi et al. (2008)

^bLAE, etil Lauroil Arginato

^cZona de inhibición alrededor de la película de plástico tratado con LAE

^dPelículas recubiertas sólo con el barniz (0% LAE)

^ePP, Polipropileno

^fCepa aislada de leche de oveja

^gPET, Polietilentereftalato

^hCECT, Colección Española de Cultivos Tipo

4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN QUESO ZAMORANO

La evolución de los recuentos de las dos cepas de *E. coli* O157:H7 en lonchas de queso Zamorano inoculadas y mantenidas a refrigeración después de ser colocadas entre dos trozos de PP o PET recubiertos sólo con barniz y con tres concentraciones de cada antimicrobiano se muestra en la Tabla V.7. y en la Figura V.2. El análisis estadístico demostró que los recuentos se veían afectados significativamente ($p < 0,05$) por el tipo de película, el compuesto antimicrobiano, el día de muestreo y la cepa ensayada.

Tabla V.7. Efecto de dos envases activos frente a dos cepas de *E.coli* O157:H7 inoculadas en lonchas de queso Zamorano.

Film PP ^c	Antimicrobiano OR ^d	Concentración Barniz ATOX	<i>E.coli</i> O157:H7 cepa M364VO ^a			<i>E.coli</i> O157:H7 cepa CECT ^b 5947		
			Día 0	Día 1	Día 7	Día0	Día1	Día7
		0%	^{ef} 4,37±0,11 ^{1,2}	4,42±0,06 ¹	4,26±0,14 ²	4,33±0,10 ¹	4,37±0,19 ¹	4,44±0,09 ¹
		4%	4,31±0,13 ¹	4,26±0,7 ¹	4,07±0,15 ²	4,40±0,06 ¹	4,19±0,07 ²	3,5±0,12 ³
		6%	4,32±0,21 ^{1,2}	4,35±0,18 ¹	4,18±0,25 ²	4,38±0,17 ^{1,2}	4,48±0,06 ¹	4,32±0,07 ²
		8%	4,16±0,13 ¹	4,23±0,17 ¹	4,16±0,11 ¹	4,36±0,09 ¹	4,13±0,08 ²	4,30±0,35 ¹
	LAE ^g	Barniz ACRIL						
		0%	4,41±0,09 ¹	4,30±0,08 ^{1,2}	4,22±0,06 ²	4,30±0,11 ¹	4,29±0,07 ¹	4,28±0,12 ¹
		4%	4,23±0,05 ¹	4,12±0,21 ¹	4,24±0,03 ¹	4,33±0,20 ^{1,2}	4,37±0,10 ¹	4,19±0,11 ²
		6%	4,47±0,12 ¹	4,25±0,13 ²	4,22±0,14 ²	4,44±0,08 ¹	4,30±0,08 ^{1, 2}	4,24±0,12 ²
		8%	4,38±0,12 ¹	4,29±0,05 ¹	4,31±0,15 ¹	4,47±0,18 ¹	4,44±0,11 ¹	4,53±0,05 ¹
PET ^h	OR	Barniz ATOX						
		0%	4,44±0,07 ¹	4,44±0,05 ¹	4,38±0,04 ¹	4,50±0,09 ¹	4,32±0,09 ²	4,31±0,14 ²
		4%	4,21±0,03 ^{1,2}	4,12±0,05 ¹	4,29±0,17 ²	4,45±0,07 ¹	4,28±0,15 ²	3,99±0,15 ³
		6%	4,46±0,22 ¹	4,39±0,19 ¹	4,07±0,04 ²	4,53±0,14 ¹	4,42±0,07 ¹	4,23±0,15 ²
		8%	4,29±0,14 ¹	4,26±0,12 ¹	4,01±0,04 ²	4,36±0,15 ¹	4,26±0,17 ¹	4,11±0,09 ²
	LAE	Barniz ACRIL						
		0%	4,35±0,09 ^{1,2}	4,39±0,03 ¹	4,21±0,09 ²	4,32±0,07 ¹	4,30±0,16 ¹	4,21±0,26 ¹
		4%	4,30±0,09 ¹	4,27±0,04 ¹	4,12±0,25 ²	4,35±0,05 ^{1,2}	4,43±0,14 ¹	4,21±0,15 ²
		6%	4,47±0,03 ¹	4,22±0,10 ²	4,13±0,16 ²	4,44±0,09 ¹	4,32±0,06 ¹	4,17±0,16 ²
		8%	4,50±0,07 ¹	4,23±0,17 ²	4,30±0,05 ²	4,44±0,08 ¹	4,40±0,12 ^{1,2}	4,28±0,09 ²

^aCepa aislada de leche de oveja

^bCECT, Colección Española de Cultivos Tipo

^cPP, Polipropileno

^dOR, aceite esencial de orégano obtenido de *Origanum vulgare*

^eCada media±desviación estándar corresponde a seis determinaciones

^fLas medias en la misma línea con diferente superíndice son significativamente diferentes (p < 0.05)

^gLAE, Etil Lauroil Arginato

^hPET, Polietilentereftalato

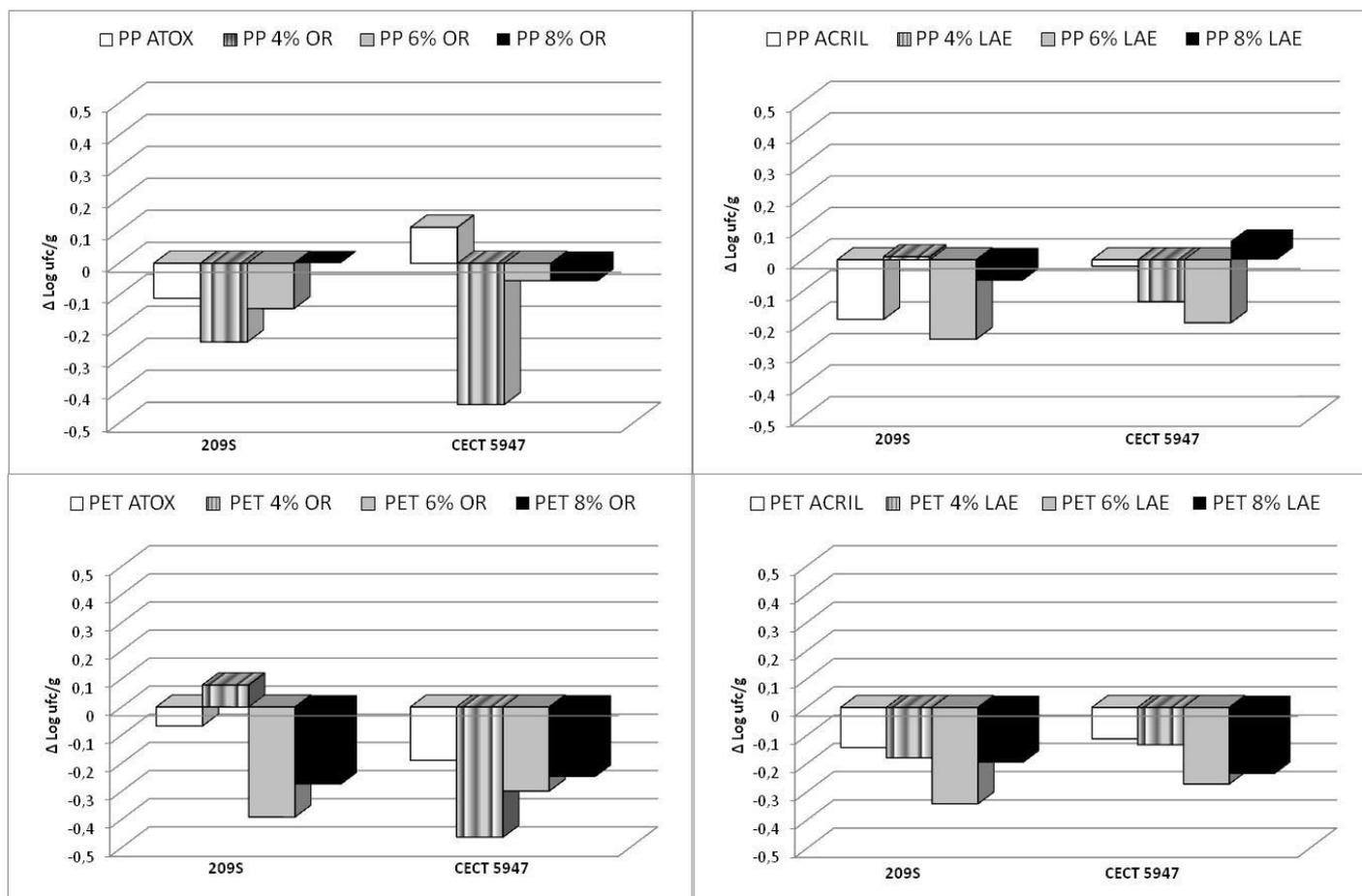


Figura V.2. Evolución de los recuentos (tras 7 días de almacenamiento) de las dos cepas CECT 5947 y M364VO inoculadas en queso y en contacto directo con láminas de PP y PET recubiertas con diferentes concentraciones de OR y LAE.

Tras siete días de almacenamiento a refrigeración, la película 4% OR PP disminuía de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) los recuentos de ambas cepas de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, esta misma película recubierta con 6% y 8% OR no reducía los recuentos de forma significativa ($p > 0,05$). En conjunto, estos resultados no coinciden con los obtenidos en las pruebas *in vitro* (ensayo en fase vapor y la norma japonesa JIS Z 2801:2000) ya que, en ambos casos, la inhibición de las películas PP aumentaba al incrementarse la concentración de OR (Tablas V. 4 y V.5).

En el queso inoculado, las películas LAE PP solo redujeron significativamente los niveles de *E. coli* O157:H7 cuando estaban recubiertas con el 6% de LAE aunque *in vitro*, empleando la técnica de contacto directo (Tabla V.6), la zona de mayor inhibición correspondía a las películas 8% LAE PP. La disminución observada en queso envasado en 4% OR PP y 6% LAE PP, aunque estadísticamente significativa, es tan baja que podría

considerarse de escaso interés práctico. Estos datos sugieren que los envases antimicrobianos basados en la liberación de OR y LAE cuando la película es de PP no son eficaces frente a las cepas utilizadas por nosotros cuando éstas se inoculan en queso Zamorano. En estudios similares realizados con otra bacteria patógena Gram-negativa mesófila (*Salmonella*) inoculada en diferentes alimentos, los resultados de la inhibición han sido mucho más eficaces (Muriel-Galet et al., 2012a; Muriel-Galet et al., 2012b).

Cuando se trataba de las películas PET recubiertas de OR, estas reducían significativamente ($p < 0,05$) los niveles de las dos cepas ensayadas cuando las lonchas de queso estaban envasadas con 4% OR (cepa de colección), 6% y 8% (ambas cepas). Resultados parecidos se observaron cuando las películas PET se recubrieron con LAE. En este caso, la película 4% LAE PET inhibió significativamente ($p < 0,05$) a la cepa aislada de leche de oveja pero no a la cepa de colección. Debe señalarse que las películas 6% OR PET y 6% LAE PET fueron más eficaces que las películas 8% OR PET y 8% LAE PET. Nuestros resultados sugieren que para el modelo de queso Zamorano, la actividad antimicrobiana de la película PET era superior a la de la película PP.

Diversos estudios acerca de la eficacia de películas con actividad antimicrobiana ponen de manifiesto que su actividad utilizando métodos *in vitro* es muy superior a la observada cuando se utilizan alimentos. Este hecho es muy frecuente y se debe no solo al microorganismo objeto del ensayo sino también al efecto interactivo de gran número de factores (Han, 2005). Entre ellos se encuentran: ciertas características del alimento como son el pH, la a_w , el contenido en grasa y proteína, los conservantes, incluidos los antioxidantes, otros aditivos, la sal y también parámetros externos como la temperatura de almacenamiento y la composición de la atmósfera. Además, cada alimento posee su flora característica (Quintavalla & Vicini, 2002; Burt, 2004; Han, 2005). Nuestros datos acerca de las propiedades físico-químicas del queso Zamorano, tras dos meses de maduración, indican que su contenido en grasa es de ca. 45 % y el de proteína del 25%. Su pH es de 5,3; su a_w de 0,95 y su contenido en NaCl de casi el 2%. La microflora dominante está constituida por bacterias acidolácticas (BAL) que suelen superar 9 ufc log/g. De todas formas hay que recordar que, aunque *E. coli* O157:H7 es una bacteria mesófila que, aparentemente, es incapaz de multiplicarse a temperaturas ≤ 7 °C, algunas cepas poseen

mecanismos genéticos específicos que les permiten sobrevivir y multiplicarse a bajas temperaturas (Vidovic et al., 2011).

5. ANÁLISIS SENSORIAL

Para establecer si existían diferencias significativas entre las muestras se utilizó, como ya se indicó en el apartado “Material y Métodos”, la Norma ISO 8587:2010 (Anónimo, 2010). Para ello, en primer lugar, se resumieron en tablas las evaluaciones anotadas en los formularios de respuestas por cada uno de los jueces para cada prueba, indicando el orden de las muestras e incluyendo un símbolo de igualdad entre muestras consideradas iguales. A continuación se decodificaron las muestras y se calcularon las sumas de las ordenaciones para cada una de ellas, comparando los resultados de estas sumas se valoró si existían diferencias entre las muestras calculando F' (ya que uno o más jueces asignaron a dos o más muestras el mismo número de orden) utilizando las siguientes fórmulas:

$$F_{test} = \frac{12}{j \cdot p (p + 1)} (R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_p^2) - 3j (p + 1)$$

Donde:

- j: número de jueces.
- p: número de muestras.
- R_1, R_2, \dots, R_p : son las sumas de las ordenaciones atribuidas al conjunto p de muestras para los j jueces.

$$F' = \frac{F}{1 - \{E/[j \cdot p (p^2 - 1)]\}}$$

$$E = (n_1^3 - n_1) + (n_2^3 - n_2) + \dots + (n_k^3 - n_k)$$

Siendo n_1, n_2, \dots, n_k el número de muestras con el mismo número de ordenación en la evaluación de distintos jueces (1, 2, ..., k).

Para saber si existían diferencias significativas entre las diferentes muestras se comparó el valor de F' con el valor crítico de distribución de chi-cuadrado con un nivel de significación (α) de 0,05. Este es un valor tabulado que aparece en la norma ISO de referencia y que para nuestros análisis sensoriales con siete muestras/día era $F' = 12,59$.

En caso de que existieran diferencias significativas entre las muestras se procedió a la identificación de los pares de muestras que diferían significativamente entre sí. Para ello, se calculó la Mínima Diferencia Significativa (MDS) para el riesgo asumido. Con un riesgo $\alpha=0,05$ (es decir, 5% de riesgo), el valor de z a considerar para el cálculo de MDS (correspondiente a una probabilidad normal bilateral de α) es igual a 1,96. Este riesgo se conoce como el riesgo por comparación o riesgo individual.

$$\text{MDS} = Z \sqrt{\frac{j \cdot p (p + 1)}{6}}$$

Si la diferencia observada entre las sumas de ordenaciones de dos productos es superior o igual a la MDS, entonces se concluye que los dos productos han obtenido ordenaciones significativamente diferentes.

Seguidamente se da cuenta de los resultados.

5.1. Análisis sensorial del queso envasado en láminas de PP recubiertas con formulaciones de OR

Entre las muestras, se obtuvo un valor $F' = 48,58$. Como este es superior a $F' = 12,59$, existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras evaluadas en este análisis sensorial.

A continuación se compararon pares de muestras. En primer lugar se compararon las lonchas de queso sin envasar con el resto de las lonchas, concluyendo que las primeras presentaban diferencias significativas ($p < 0,05$) con el queso envasado en contacto directo con láminas de PP recubiertas con las formulaciones de OR (4, 6 y 8%) almacenados durante 24 horas. También presentaban diferencias significativas ($p < 0,05$) con el queso envasado en contacto con láminas recubiertas con la formulación de OR al 6% y almacenadas durante una semana.

Posteriormente se compararon las lonchas de queso en contacto con láminas de PP recubiertas con OR tras 24 horas y una semana de almacenamiento. El queso almacenado durante 24 horas no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) con el queso envasado durante una semana a igual concentración de OR.

En los comentarios, los jueces señalaron que les resultó difícil realizar la cata debido al número de muestras (les pareció elevado), y a que el sabor a orégano persistía bastante. Nuestros datos indican que para las películas OR PP, los jueces detectaron el orégano en las muestras envasadas a las 24 horas y, algo menos, a los siete días de almacenamiento.

5.2. Análisis sensorial del queso envasado en láminas de PET recubiertas con formulaciones de OR

En este caso se obtuvo una $F' = 9,70$ (valor inferior al tabulado $F' = 12,59$) por lo que no existían diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras valoradas en este análisis sensorial.

En los comentarios los jueces indicaron que les había resultado más difícil que el análisis de las muestras en contacto con láminas OR PP pero que se percibía el sabor a orégano. Por tanto, se puede concluir que, aunque como en el caso de las láminas OR PP, se percibía el sabor a orégano, este fue menos intenso, ya que no se detectaron diferencias significativas entre las muestras.

5.3. Análisis sensorial del queso envasado en láminas de PP recubiertas con formulaciones de LAE

En este caso se obtuvo una $F' = 7,21$. Este valor es inferior al valor tabulado ($F' = 12,59$) con lo que se pudo concluir que no existían diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras valoradas en este análisis sensorial.

En los comentarios los jueces también señalaron que no encontraron diferencias entre las muestras.

5.4. Análisis sensorial del queso envasado en láminas de PET recubiertas con formulaciones de LAE

En este caso se obtuvo una $F' = 12,3$. Este resultado también era inferior al valor tabulado ($F' = 12,59$) por lo que se pudo concluir que no existían diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras estudiadas.

En los comentarios los jueces reflejaron que, al igual que en el caso anterior, no encontraron diferencias entre las muestras.

Los resultados del análisis sensorial indican que LAE y/o PET no afectan significativamente a las características organolépticas del queso Zamorano. Aunque en el caso de las láminas de PET recubiertas con las diferentes formulaciones de OR los jueces no detectaron diferencias significativas entre las muestras, sí que detectaron sabor a OR por lo que no sería recomendable su uso en este caso.

En conjunto, los datos del trabajo recogido en este capítulo ponen de manifiesto que las películas PP y PET recubiertas con OR y LAE son eficaces para inhibir cepas de *E. coli* O157:H7, tanto de colección como de origen ovino, cuando se prueban *in vitro*. Sin embargo, en el alimento ensayado (queso Zamorano) su efecto es menor, dependiendo principalmente de la película y también del agente antimicrobiano. No obstante, las películas PET recubiertas de concentraciones iguales o superiores al 6% LAE podrían ser útiles para reducir los niveles de *E. coli* O157:H7 en queso de oveja madurado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anónimo. 2010. UNE-ISO 8587:2010. Análisis sensorial. Metodología. Ordenación. International Organization for Standardization. Ginebra.
2. Anónimo. 2009. Reglamento (CE) Nº 450/2009 de la Comisión de 29 de Mayo de 2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos. D. O., L 135: 3-11.
3. Anónimo. 2000. JIS Z 2801:2000. Antimicrobial products- Test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Standards Association.
4. Becerril, A., Manso, S., Nerin, C. and Gómez-Lus, R. 2013. Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 32: 404-408.
5. Becerril, R., Gomez-Lus, R., Goni, P., Lopez, P. and Nerin, 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.
6. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223-253.
7. 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.

8. Caro, I. & García-Armesto, M. R. 2007. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 116: 410-413.
9. Caro, I., Mateo, J., Rúa, J. and García-Armesto, M. R. 2011. Occurrence of *Escherichia coli* O157, O111 and O26 in raw ewe's milk and performance of two enrichment broths and two plating media used for its assessment. *Int. J. Food Microbiol.*, 146: 84-87.
10. Cha, D. S. & Chinnan, M. S. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44: 223-237.
11. Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H. and Vernozy-Rozand, C. 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol. Infect.*, 134: 143-146.
12. Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K. and Govaris, A. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.*, 162 (2): 190-212.
13. Ferens, W. A. & Hovde, C. J. 2011. *Escherichia coli* O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog. Dis.*, 8: 465-487.
14. Gutiérrez, J., Rodríguez, G., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. 2008. Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: antimicrobial and sensory screening. *J. Food Prot.*, 71: 1846-1854.

15. Gutiérrez, L., Batlle, R., Sánchez, C. and Nerín, C. 2010. New approach to study the mechanism of antimicrobial protection of an active packaging. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7: 1063-1069.
16. Han, J. H. 2005. Introduction to active food packaging technologies. In: Han, J. H. (Ed.), *Innovations in food packaging*. Academic Press, Londres, pp. 80-107.
17. Higuera, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. and Rollini, M. 2013. Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N- α -dodecanoyl-L-arginate) and its application to fresh chicken. *Int. J. Food Microbiol.*, 165: 339-345.
18. Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhäusern, S., Guerrieri, E., Messi, P., Sabia, C., Anacarso, I. and Bondi, M. 2008. Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *Int. J. Food Microbiol.*, 123: 281-287.
19. López, P., Sánchez, C., Batlle, R. and Nerín, C. 2007a. Vapor-Phase Activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano Essential Oils and Key Constituents against Foodborne Microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 4348-4356.
20. López, P., Sánchez, C., Batlle, R. and Nerín, C. 2007b. Development of Flexible Antimicrobial Films Using Essential Oils as Active Agents. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 8814-8824.

Capítulo V. Bibliografía

21. Marino, M., Bersani, C. and Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int. J. Food Microbiol.*, 67: 187-195.

22. Meng, J., Jeffrey, T. L., Zhao, T. and Doyle, M. P. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Doyle, M. P. and Buchanan, R. L. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA, pp. 287-309.

23. Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R. and Hernández-Muñoz, P. 2012a. Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *Int. J. Food Microbiol.*, 157: 239-244.

24. Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., López-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R. and Hernández-Muñoz, P. 2012b. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *Int. J. Food Microbiol.*, 157: 195-201.

25. Nataro, P. J. & Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11: 142-201.

26. Nerín, C. & Garcés, O. 2006. Antimicrobial packaging based on the use of natural extracts and the process to obtain this packaging. European Patent Application EP 1 657 181 A1.

27. Quintavalla, S. & Vicini, L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci.*, 62: 373-380.

28. Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J. E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R. and Alonso, J. M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int. J. Food Microbiol.*, 107: 212-217.
29. Rodríguez, A., Nerín, C. and Batlle, R. 2008. New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 6364-6369.
30. Rodríguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X. and Manresa, A. 2004. Cellular effects of monohydrochloride of l-arginine, N α -lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 903-912.
31. Rooney, M. L. 2005. Introduction to active food packaging technologies. In: Han, J. H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Academic Press, Londres, pp. 63-79.
32. Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. and Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.*, 91: 621-632.
33. Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. and Bigger, S. W. 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci.*, 68: 408-420.

Capítulo V. Bibliografía

34. Theinsathid, P., Visessanguan, W., Kruenate, J., Kingcha, Y. and Keeratipibul, S. 2012. Antimicrobial Activity of Lauric Arginate-Coated Polylactic Acid Films against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on Cooked Sliced Ham. J. Food Sci., 77: M142-M149.
35. Turgis, M., Vu, K. D., Dupont, C. and Lacroix, M. 2012. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. Food Res. Int., 48: 696-702.
36. Vidovic, S., Mangalappalli-Illathu, A. K. and Korber, D. R. 2011. Prolonged cold stress response of *Escherichia coli* O157 and the role of rpoS. Int. J. Food Microbiol., 146: 163-169.



CONCLUSIONES

PRIMERA. A pesar de la eficacia del sistema inmunoenzimático Prospect® Shiga Toxin para la detección de toxinas Shiga en muestras de heces, este trabajo demuestra que no resulta útil para su detección en leche de oveja.

SEGUNDA. Aunque la presencia de genes que codifican para las toxinas Shiga parece ser frecuente en las muestras de leche de oveja, el aislamiento de cepas de *Escherichia coli* productoras de estas toxinas es bajo. Sin embargo, la leche de oveja es una fuente importante de cepas de *Escherichia coli* enteropatógenicas.

TERCERA. La incidencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga en muestras de heces, leche y agua no parece estar relacionada con las puntuaciones obtenidas por las explotaciones en las auditorías realizadas para su certificación.

CUARTA. El Dryspot *E. coli* O157 test es útil para la identificación de cepas de *Escherichia coli* O157, ya que todas aquellas que fueron positivas se confirmaron por técnicas convencionales, albergando además el gen que codifica para el antígeno somático O157.

QUINTA. La leche de oveja, las heces de estos animales y el agua de bebida contienen cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga. El agua de bebida contaminada puede ser la causa de la diseminación dentro del rebaño. Por otro lado, teniendo en cuenta las similitudes observadas en el perfil de genes de virulencia y con la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado, el origen más probable de la contaminación de la leche son las heces, bien directa o indirectamente.

SEXTA. Las similitudes halladas entre las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga de origen ovino y algunas de origen humano en los genes de virulencia, el perfil de bandas obtenido con la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado y el fagotipo en el caso de cepas O157:H7, confirma que los animales de la especie ovina constituyen un reservorio de esta bacteria y que su leche y productos derivados no tratados térmicamente pueden suponer un riesgo en relación con esta bacteria.

SÉPTIMA. La incidencia de cepas O157:H7 es menor que la de las cepas no-O157. Sin embargo, todas ellas poseían genes de virulencia, siendo algunas resistentes a uno o

varios agentes antimicrobianos. Por tanto es importante utilizar correctamente los tratamientos veterinarios para así reducir al mínimo la aparición de resistencias.

OCTAVA. La relación encontrada, tanto con la técnica “multilocus sequence typing” como en los patrones de bandas obtenidos con la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado, entre cepas de *Escherichia coli* enteropatógenicas atípicas sugieren que el agua de las explotaciones de ovino puede constituir una vía importante de contaminación de la leche por estas cepas.

NOVENA. La presencia en leche de ovino de cepas de *Escherichia coli* enteropatógenicas atípicas relacionadas con otras causantes de enfermedad en humanos sugiere una posible ruta de transmisión de estos patógenos emergentes con el consiguiente riesgo para la salud.

DÉCIMA. Las bacterias presentes de forma natural en la leche (principalmente bacterias acidolácticas) parecen ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga, aunque no garantizan su ausencia tal y como muestran las diferencias observadas en los recuentos de estas cepas durante el almacenamiento de leche cruda y pasteurizada.

UNDÉCIMA. Los recuentos de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga en leche almacenada a las temperaturas exigidas por la normativa actual de la Unión Europea disminuyen, se mantienen o aumentan. Por tanto, estas temperaturas no garantizan la ausencia de estas cepas en la leche, lo que puede suponer un riesgo si se destina a la fabricación de productos lácteos no tratados térmicamente.

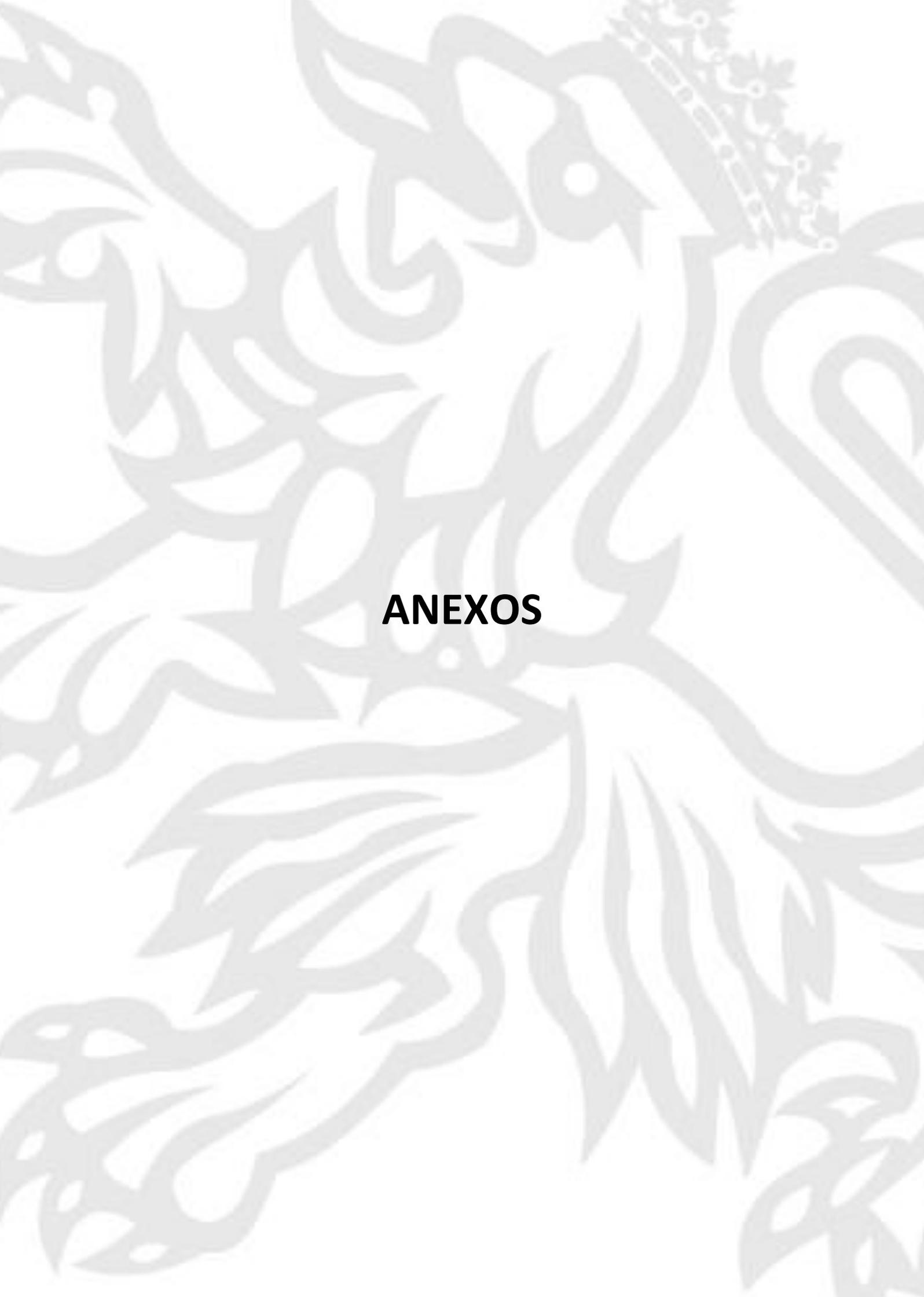
DUODÉCIMA. El comportamiento de *Escherichia coli* O157 durante la elaboración y maduración del queso tipo Zamorano sugiere que, aunque disminuye el nivel inicialmente presente, la bacteria puede permanecer viable y representar un riesgo para el consumidor teniendo en cuenta su baja dosis infectiva.

DECIMOTERCERA. Las láminas de polipropileno y polietilentereftalato recubiertas con formulaciones de aceite esencial de orégano y etil lauroil arginato son eficaces para inhibir *in vitro* cepas de *Escherichia coli* O157:H7, tanto de colección como de origen

Conclusiones

ovino. Sin embargo, en queso Zamorano almacenado en contacto directo con éstas láminas el efecto es menor debido a las características del alimento, aunque las películas de polietilentereftalato recubiertas de concentraciones iguales o superiores al 6% de etil lauroil arginato podrían ser útiles para reducir los niveles de *Escherichia coli* O157:H7 en queso de oveja madurado. Además, el etil lauroil arginato no afecta significativamente a las características organolépticas de este producto lácteo.

Conclusiones



ANEXOS

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

Verónica Otero, José-María Rodríguez-Calleja, Andrés Otero, María-Luisa García-López, Jesús A. Santos

Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, León, Spain

A collection of 81 isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) was obtained from samples of bulk tank sheep milk (62 isolates), ovine feces (4 isolates), sheep farm environment (water, 4 isolates; air, 1 isolate), and human stool samples (9 isolates). The strains were considered atypical EPEC organisms, carrying the *eae* gene without harboring the pEAF plasmid. Multilocus sequence typing (MLST) was carried out with seven housekeeping genes and 19 sequence types (ST) were detected, with none of them having been previously reported for atypical EPEC. The most frequent ST included 41 strains isolated from milk and human stool samples. Genetic typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) resulted in 57 patterns which grouped in 24 clusters. Comparison of strains isolated from the different samples showed phylogenetic relationships between milk and human isolates and also between milk and water isolates. The results obtained show a possible risk for humans due to the presence of atypical EPEC in ewes' milk and suggest a transmission route for this emerging pathogen through contaminated water.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is an important group of diarrheagenic *E. coli*, being responsible for outbreaks of infant diarrhea in developing countries, with fatality rates as high as 30% (1), and increasingly being implicated as a causative agent of diarrhea in developed countries, affecting all age groups (2, 3). This epidemiological difference between developing and developed countries is linked to the characteristics of EPEC strains. Typical EPEC organisms, defined as strains of *E. coli* that produce an attaching and effacing lesion in intestinal cells, carry the EAF virulence plasmid, and do not produce Shiga-like toxins, are predominant in developing countries, whereas atypical EPEC isolates, which are similar to typical EPEC isolates but do not possess the EAF virulence plasmid, are emerging pathogens in developed countries (2, 4, 5).

The reservoir of typical EPEC strains is thought to be human carriers (3), and those strains are rarely isolated from animals (2). In contrast, atypical EPEC strains are readily isolated from humans and animals; there is no confirmation of direct transmission from animals to humans, but the fact that strains belonging to the same serogroups have been found in animal and human diseases suggests that animals can be an important reservoir of atypical EPEC that can be transmitted to humans (5) and also from humans to animals (6). The isolation from food production animals and farm environments has been reported (7–9), and milk and dairy products appear to be regularly contaminated with EPEC strains (10–14), even though other studies failed to isolate EPEC from milk samples (7, 15). Taking into account that farm animals and milk and dairy products carry atypical EPEC strains, it can be presumed that a possible route of transmission is from animals to food and then to humans.

The aim of this study was to analyze the presence of atypical EPEC strains in sheep milk and in the environment of sheep farms and to compare the phylogenetic relationships of isolates obtained from these samples and isolates obtained from humans to search for possible routes of transmission of EPEC to humans.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. Bulk tank ewes' milk samples were obtained from 388 farms located along 10 different milk collection routes in northwest Spain. Milk samples of 100 ml were aseptically taken in sterile containers.

Additional samples from air, water, feed, and feces were taken from 10 selected farms (one farm at the end of each collection route). Ten-liter air samples were collected using a microbial air sampler (Biotest Hycon, Dreieich, Germany) fitted with a tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) strip. Water troughs and feed (silage) samples were taken in sterile containers of 500 ml and 250 g, respectively. Sampling of feces in farm premises was done with boot swabs by following the protocol outlined by the EU for monitoring the reduction of *Salmonella* in laying hens. In brief, boot swabs, moistened with a solution of 0.1% peptone and 0.9% NaCl, were used to walk through the premises using a route that produced a sample for all parts of the farm. A minimum of four samples (two pairs of boot swabs) were collected, with the swabs being changed every 100 steps. Boot swabs were removed carefully and stored in sterile zipper storage bags for transport to the laboratory.

Milk and farm environment samples were immediately transported to the laboratory in an insulated cooler. Temperature on arrival to the laboratory was always under 8°C.

Suspected diarrheagenic *E. coli* isolates from stool samples of patients with gastrointestinal disease were kindly provided by the Microbiology Service of the University Hospital of León.

Sample processing. Fifty milliliters of milk was cultured in 450 ml of tryptone soya broth (TSB; Oxoid) plus 0.6% yeast extract (TSBYE; Oxoid) at 42°C for 18 h. An aliquot of the enriched sample was streaked onto CT-SMAC (Oxoid) plates and incubated at 37°C for 24 h. Pink (sorbitol fermenters) and colorless (nonfermenters) colonies

Received 4 June 2013 Accepted 12 July 2013

Published ahead of print 19 July 2013

Address correspondence to Jesús A. Santos, j.santos@unileon.es.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01809-13

TABLE 1 Target genes and primer sequences for the PCR detection of EPEC gene markers

Target gene or plasmid and primer	Sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Reference
Genes			
<i>stx</i> ₁			
Stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	24
Stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<i>stx</i> ₂			
Stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	
Stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>eae</i>			
SK1	CCCGAATTCCGGCACAAGCATAAGC	881	25
SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG		
<i>bfpA</i>			
EP1	ATTGGTGCTTGCGCTTGTCTGC	326	27
EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
Plasmid			
pEAF			
EAF1	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	397	26
EAF25	TATGGGGACCATGTATTATCA		

were picked and preserved at -40°C in TSB plus 40% glycerol for further characterization.

TSA strips from the air sampling were homogenized with 50 ml of TSBYE in a Masticator blender (IUL SA, Barcelona, Spain). Water samples (250 ml) were filtered through sterile 0.45- μm filters, which were then incubated in 50 ml TSBYE. Twenty five g of feed pellets was blended with 225 ml of TSBYE. Boot swabs were unpacked and placed in 225 ml of TSBYE. All cultures were incubated and plated onto CT-SMAC as described above.

PCR detection of enteropathogenic *E. coli*. Presumptive EPEC isolates were cultured in TSB at 37°C for 18 h, and DNA was released by heat lysis. The template DNA was screened by PCR for the presence of the target genes *stx*₁, *stx*₂, *eae*, and *bfpA*, as well as plasmid pEAF, using the primers described in Table 1. PCR was carried out in a Mastercycler Personal (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany) in a final volume of 25 μl and an annealing temperature of 56°C . PCR products (5 μl) were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and viewed after ethidium bromide staining under UV light.

MLST. Multilocus sequence typing (MLST) was carried out by amplifying and sequencing seven housekeeping genes (*arcA*, *cyaA*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mtlD*, and *rpoS*), as described by Moura et al. (6), by following the protocol detailed at the EcMLST website (<http://shigatox.net/new/tools/ecmlst.html>). PCR products were purified with a NucleoSpin gel and PCR cleanup kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Both strands were sequenced in a Megabace 500 sequencer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Raw sequences were visually reviewed and edited using the Chromas Lite 2.1 software (Technelysium, South Brisbane, Queensland, Australia) and aligned with the ClustalW algorithm of the MEGA5 software (16). Each gene locus was assigned an allele number by searching the EcMLST database. New allele numbers were assigned by the curator of the database upon submission and revision of sequence chromatograms. Each isolate was assigned an arbitrary sequence type (ST) number according to the allele profile.

Lineage assignment and phylogenetic analysis. Grouping of isolates into clonal complexes according to the number of single-locus and double-locus variants was done with the eBursts algorithm implemented in the START2 program (17). Split decomposition analysis was performed with Splitstree software for Windows (18).

A concatenated sequence constructed from the individual gene sequences (in the order of *arcA*, *cyaA*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mtlD*, *rpoS*) was prepared for one representative strain of each ST. Concatenated se-

quences were aligned and the phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method, with the distances estimated by the Kimura 2-parameter model and a bootstrapping of 1,000 replications using MEGA5 software.

PFGE. Genomic DNA preparation for pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis was carried out according to the procedure of PulseNet (19). DNA was digested with 30 U XbaI (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), and the fragments were resolved in a 1% Seakem Gold agarose gel (Lonza, Rockland, ME) in a contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) DRIII apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) during 19 h with the following conditions: 14°C , ramp of 2.2 to 54.2 s, 120° angle, and voltage of 6 V/cm. Comparison of PFGE profiles was done with the GelCompar 6.1 software (Applied Maths, St. Martens Latem, Belgium). Similarities were obtained using the Dice coefficient at 0.5% optimization and 1.5% tolerance, and a dendrogram was constructed with the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA) clustering method.

RESULTS

EPEC isolation and identification. A total of 62 suspected isolates were obtained from 55 of the 388 bulk tank milk samples (14.17%). All of the isolates were considered atypical EPEC, carrying the *eae* gene without amplifying any of the additional target genes (*stx*₁, *stx*₂, and *bfpA*) or pEAF. Ten more isolates were recovered from the environmental samples taken from 5 out of 10 farms (50%): five isolates were obtained from water trough samples taken from four different farms, four isolates were from feces from four different farms, and one isolate was obtained from an air sample; moreover, 9 atypical EPEC isolates were confirmed from human stools.

Multilocus sequence typing and phylogenetic analysis. Sequences of seven housekeeping genes were obtained from all 81 isolates, and 19 ST were detected (Table 2); none of them were previously reported for atypical EPEC in studies carried out with the same genes (6, 20). The most frequent ST was ST 14, including 41 isolates, all of them obtained from milk and clinical samples. The allele frequency of the housekeeping genes ranged from 6 to 12 alleles per locus, with the most variable being loci *icdA* and *mtlD* with 12 alleles each. Ten new alleles were detected in five different genes (Table 2).

TABLE 2 Allele profile and relative frequency of ST detected after MLST analysis of 81 EPEC isolates

ST	Allele no. of:							Relative frequency	Origin of isolates
	<i>arcA</i>	<i>cyaA</i>	<i>fadD</i>	<i>icdA</i>	<i>lysP</i>	<i>mitD</i>	<i>rpoS</i>		
1	2	36 ^a	115	8	17	45 ^a	71 ^a	1	Clinical
2	3	2	13	4	1	13	1	1	Milk
3	3	3	2	2	1	3	1	1	Clinical
4	3	3	2	2	1	4	1	6	Milk and water
5	3	3	13	4	1	13	1	1	Milk
6	3	3	13	39	1	13	17	1	Feces
7	3	3	13	203 ^a	1	13	69 ^a	2	Milk and water
8	3	3	20	23	1	31	1	8	Milk
9	3	3	20	23	1	31	70 ^a	1	Water
10	3	3	49	4	1	13	1	1	Milk
11	3	11	13	39	1	43 ^a	1	3	Milk and water
12	6	1	4	3	2	11	8	1	Milk
13	7	26	13	54	35	34	46	1	Milk
14	8	2	1	15	1	2	1	41	Milk and clinical
15	8	3	2	4	1	13	1	4	Milk, air, and feces
16	9	2	1	1	1	41	1	3	Milk and clinical
17	9	3	2	4	1	13	1	3	Feces and clinical
18	24	32	6	75	4	42	26	1	Milk
19	27 ^a	35 ^a	110	136	78	44 ^a	17	1	Water

^a New alleles.

Three clonal complexes were revealed by eBURST analysis, grouping 7, 2, and 2 ST, respectively. Clonal group 1 was centered on ST 5, with ST 2 and ST 10 as a single-locus variant (SLV) and ST 6, ST 7, ST 15, and ST 17 as a double-locus variant (DLV). Clonal group 2 contained ST 3 and ST 4, whereas clonal group 3 included ST 8 and ST 9. The remaining 8 ST were considered singletons, including the most frequent ST, ST 14. A SplitsTree graph (Fig. 1) shows the relative distances between STs.

Phylogenetic analysis of the supergene is shown in Fig. 2, showing a clustering of STs similar to that obtained with SplitsTree, with high bootstrapping values.

Some STs grouped together isolates from different origins, as

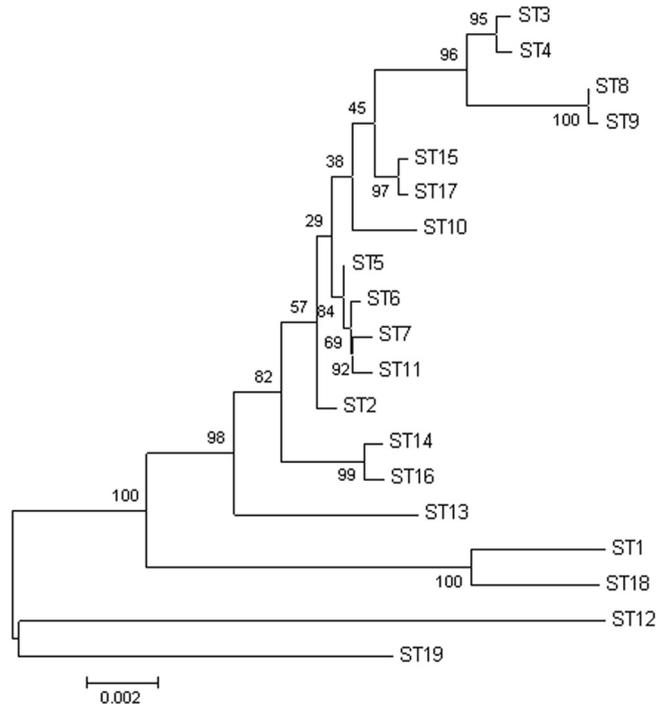


FIG 2 Neighbor-joining tree obtained from the phylogenetic analysis of the combined nucleotide sequences of the seven housekeeping genes in representatives from each ST. Bootstrapping values are shown in branch nodes.

in ST 4, which grouped five isolates obtained from milk produced on five farms with a water strain isolated from a different farm. ST 7 included water and milk samples isolated from different locations, ST 11 was composed of one water and two milk isolates, ST

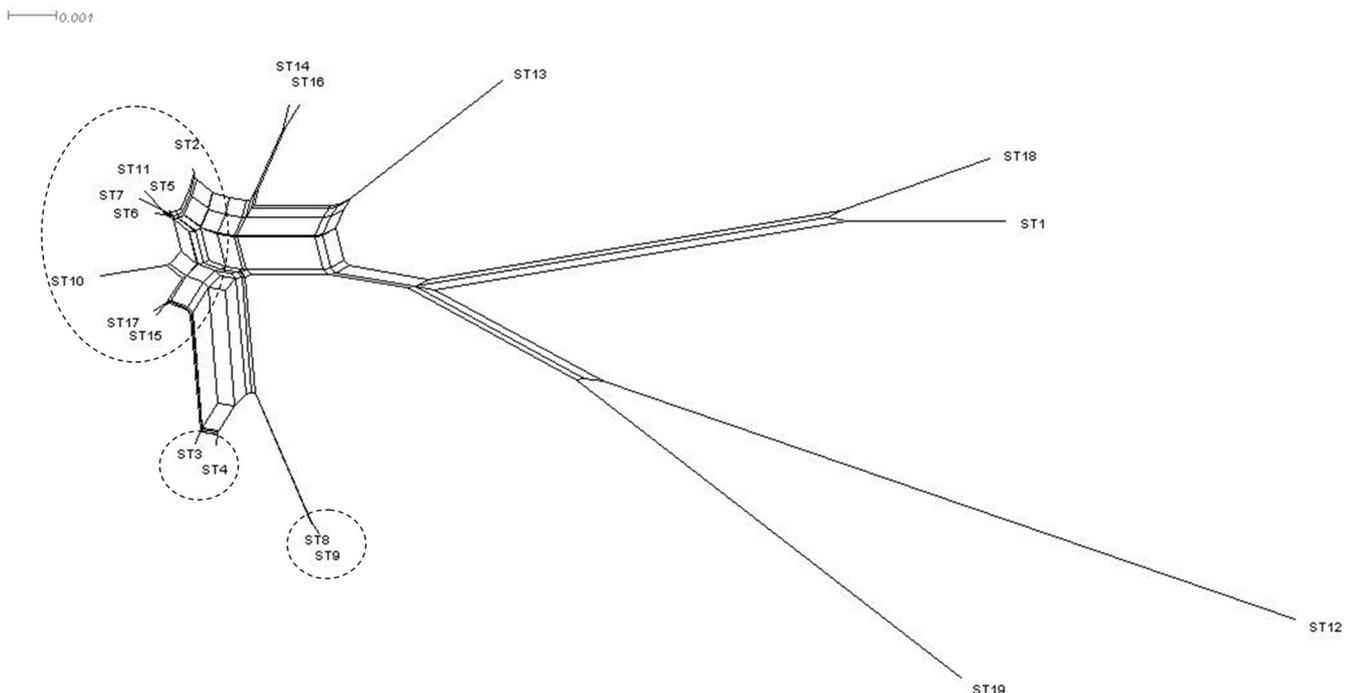


FIG 1 Phylogenetic splits network obtained after allele profile analysis with eBURST algorithm. Clonal complexes are indicated by broken lines.

15 included two isolates from milk, one from air, and one from animal feces samples taken in different farms, ST 16 was composed of two clinical and one milk isolate, and ST 17 included two isolates from animal feces and one clinical isolate. An interesting finding was the absence of environmental isolates from ST 14 (Table 3).

Pulsed-field gel electrophoresis. PFGE typing of 81 isolates resulted in 57 patterns, which grouped in 24 clusters with a minimum cutoff value of 74.5% (Fig. 3). Identical profiles were detected in isolates from milk (34 strains in pulsotypes I, IV, X, XII, XIV, and XIX) and clinical samples (2 strains in pulsotype XVI) and between one isolate from milk and one isolate from air (pulsotype VII). All of the isolates with indistinguishable PFGE profiles belong to the same ST. Nine clusters grouped isolates from different origins: milk and water (I, IV, XVII, and XVIII), milk and ovine feces (V), milk, air and ovine feces (VII), clinical samples and ovine feces (IX), and milk and clinical samples (VI and XV).

Table 3 summarizes the features of the 81 strains investigated in this study.

DISCUSSION

Humans have long been considered the main reservoir of EPEC (3), but this assumption is being revised in light of the characteristics of atypical EPEC strains, which are regularly found in animals (2, 5). The increasing isolation of atypical EPEC strains from foods of animal origin (10, 12, 14, 21) suggests that different animal species act as reservoirs for these microorganisms and represent a source of infections for humans, as already proposed by other authors (6, 8).

In this study, bulk tank sheep milk tested positive for 14.17% of the samples, and atypical EPEC strains were also isolated from the environment of the farm and from feces of the animals. A high degree of phylogenetic heterogeneity was observed among the strains, which form 19 sequence types and 24 pulsotypes. The genetic diversity in atypical EPEC appears to be a common trait, as already reported (22). In spite of the heterogeneity, comparison of the strains isolated from milk and farm environments to isolates obtained from human patients showed a clear relationship between milk and human isolates; thus, the main ST (ST 14) was composed of strains of those origins. This relationship was demonstrated by PFGE typing as well (clusters VI and XV) (Fig. 3). Another interesting finding of this study is the similarities observed between water and milk isolates, which grouped together in two ST and four PFGE clusters (Fig. 3).

The results obtained in this study do not clarify the routes of transmission of EPEC but indicate that strains that appear in milk are similar to strains causing disease in humans. Why the milk became contaminated remains unresolved, but similarities between milk and water isolates suggest a way of transmission through water used in the production of milk, either for drinking or for cleaning equipment. Robins-Browne et al. (23) showed that atypical EPEC strains are an important cause of human gastroenteritis acquired through water consumption, and García-Díez et al. (10) reported that molecular characteristics found in atypical EPEC isolates from samples of surface water were similar to those detected in human samples. These pieces of evidence, together with the findings of this study, suggest a possible route of human infection.

In conclusion, this study shows that ewes' milk carries strains

TABLE 3 Genotypic characteristics and origin (farm registration number and type of sample) of 81 EPEC isolates studied

Strain	PFGE type	ST	Farm no.	Type of sample
M271VO	1	4	158	Milk
M277aVO	1	4	160	Milk
M277bVO	1	4	160	Milk
M289VO	1	4	167	Milk
F15VO	1	4	187	Water
M387VO	1	4	234	Milk
C156VO	2	3		Clinical
C289VO	3	16		Clinical
M39VO	4	8	31	Milk
M77VO	4	8	87	Milk
M312VO	4	8	179	Milk
M367VO	4	8	210	Milk
M370VO	4	8	213	Milk
M434VO	4	8	275	Milk
M443VO	4	8	287	Milk
M523VO	4	8	361	Milk
F12VO	4	9	42	Water
F23VO	5	6	66	Feces
M407VO	5	15	243	Milk
F20VO	6	15	64	Air
M313VO	6	15	179	Milk
F16VO	6	15	187	Feces
M278VO	6	16	160	Milk
C294VO	6	16		Clinical
F21VO	8	17	64	Feces
F14VO	9	17	157	Feces
C322VO	9	17		Clinical
M361VO	10	14	207	Milk
M385VO	10	14	233	Milk
M337VO	11	14	189	Milk
M229VO	12	14	77	Milk
M232VO	12	14	91	Milk
M251VO	12	14	106	Milk
M124VO	12	14	223	Milk
M138VO	12	14	261	Milk
M142VO	12	14	314	Milk
M487VO	12	14	336	Milk
M176VO	12	14	375	Milk
M330VO	13	14	185	Milk
M341VO	13	14	191	Milk
M42VO	14	14	32	Milk
M51VO	14	14	58	Milk
M54VO	14	14	59	Milk
M59VO	14	14	61	Milk
M78VO	14	14	87	Milk
M242VO	14	14	98	Milk
M247VO	14	14	103	Milk
M82VO	14	14	114	Milk
M90VO	14	14	120	Milk
M92VO	14	14	125	Milk
M93VO	14	14	125	Milk
M100VO	14	14	127	Milk
M99VO	14	14	127	Milk
M105VO	14	14	145	Milk
M106VO	14	14	148	Milk
M108VO	14	14	151	Milk
M110VO	14	14	156	Milk
M111VO	14	14	157	Milk
M126VO	14	14	223	Milk
M130VO	14	14	224	Milk
M186VO	14	14	381	Milk
M187VO	14	14	382	Milk
M344VO	15	12	193	Milk
C147VO	15	14		Clinical
C171VO	16	14		Clinical
C198VO	16	14		Clinical
C212VO	16	14		Clinical
F22VO	17	11	66	Water
M448aVO	17	11	296	Milk
M532VO	17	11	388	Milk
F17VO	18	7	42	Water
M102VO	18	7	133	Milk
M508VO	19	14	354	Milk
M151VO	19	14	364	Milk
M254aVO	20	2	107	Milk
M29aVO	20	5	24	Milk
M442aVO	20	10	286	Milk
M36VO	21	18	29	Milk
M438aVO	22	13	281	Milk
F13VO	23	19	157	Water
C22VO	24	1		Clinical

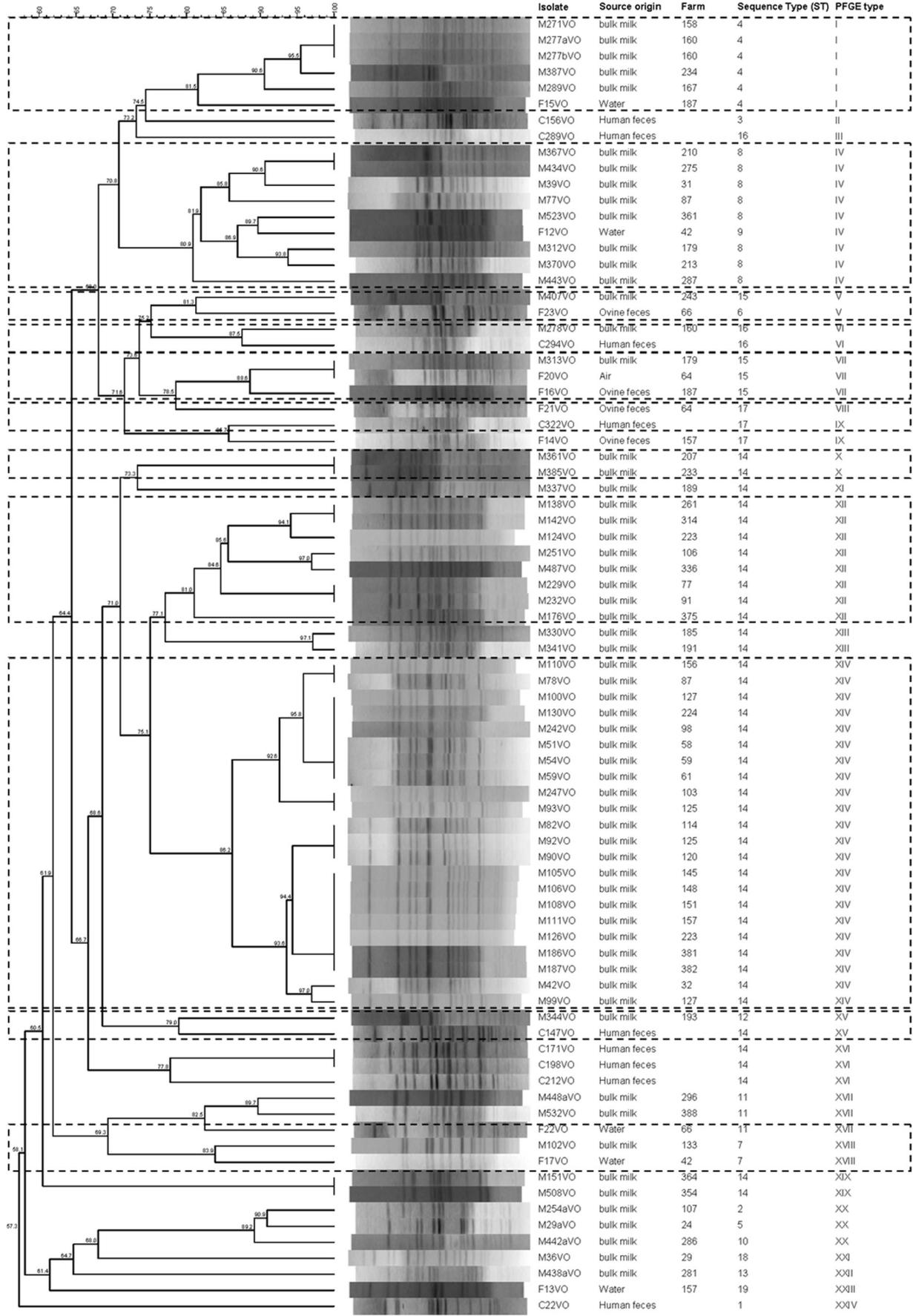


FIG 3 PFGE profiles of 81 atypical EPEC isolates obtained from ewes' milk, farm environment, and clinical samples. The corresponding sequence types (ST) are also listed. Main groups are marked by broken lines.

of atypical EPEC related to those found in human samples and suggests possible transmission routes for this emerging pathogen.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by project AGL2011-26118/ALI of the Spanish R&D program (Ministry of Economy and Competitiveness) and Junta de Castilla y León (Ayuda Grupo de Excelencia GR155). Verónica Otero was supported by a grant from the FPU program of the Spanish government.

We are grateful for the valuable assistance of Silvia Herrera-León and Sergio Sánchez from the Bacteriology Department of the National Microbiology Centre of the Instituto de Salud Carlos III and María Antonia Remacha from the Microbiology Service of the University Hospital of León.

REFERENCES

- Chen DH, Frankel G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:83–98.
- Trabulsi LR, Keller R, Gomes T. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8:508–513.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142–201.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123–140.
- Hernandes RT, Elias WP, Vieira M, Gomes T. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 297:137–149.
- Moura RA, Sircili MP, Leomil L, Matté MHT, Elias LRWP, Irino K, Pestana de Castro AF. 2009. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7399–7408.
- Cortés C, De la Fuente R, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Dhahi G, Mora A, Justel P, Contreras A, Sanchez 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.
- Blanco M, Schumacher S, Tasara T, Zweifel C, Blanco J, Dahbi G, Blanco J, Stephan R. 2005. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae- η 2). *BMC Microbiol.* 5:23. doi:10.1186/1471-2180-5-23.
- Farooq S, Hussain I, Mir MA, Bhat MA, Wani SA. 2009. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:692–697.
- García Díez M, Meindl K, Frässdorf J, Wolf S, Schälch B, Busch U. 2009. Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in food and water in Bavaria in 2007. *Arch. Lebensmittelhyg.* 60:77–81.
- Altalhi AD, Hassan SA. 2009. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food Control* 20:913–917.
- 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.
- Carneiro LAM, Lins MC, Garcia FRA, Silva APS, Mauller PM, Alves GB, Rosa ACP, Andrade JRC, Freitas-Almeida AC, Queiroz MLP. 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.
- da Silva ZN, Cunha AS, Lins MC, Carneiro LAM, Almeida ACF, Queiroz MLP. 2001. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Rev. Saúde Pública* 35:375–379.
- Son I, Van Kessel JA, Karns JS. 2009. Genotypic diversity of *Escherichia coli* in a dairy farm. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:837–847.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731–2739.
- Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC. 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17:1230–1231.
- Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23:254–267.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3:59–67.
- Leomil L, Pestana de Castro AF, Krause G, Schmidt H, Beutin L. 2005. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. *FEMS Microbiol. Lett.* 249:335–342.
- Bandyopadhyay S, Lodh C, Rahaman H, Bhattacharya D, Bera AK, Ahmed FA, Mahanti A, Samanta I, Mondal DK, Bandyopadhyay S, Sarkar S, Dutta TK, Maity S, Paul V, Ghosh MK, Sarkar M, Baruah KK. 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.
- Afset JE, 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.
- Robins-Browne RM, Bordun AM, Tauschek M, Bennett-Wood VR, Russell J, Oppedisano F, Lister NA, Bettelheim KA, Fairley CK, Sinclair MI, Hellard ME. 2004. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1797–1805.
- Paton AW, Paton JC. 1998. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. *J. Clin. Microbiol.* 36:598–602.
- Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marches O, Caprioli A. 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 68:64–71.
- Franke J, Franke S, Schmidt H, Schwarzkopf A, Wieler LH, Baljer G, Beutin L, Karch H. 1994. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J. Clin. Microbiol.* 32:2460–2463.
- Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* 33:1375–1377.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains *in vitro* and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano)



Verónica Otero^a, Raquel Becerril^b, Jesús A. Santos^a, José M. Rodríguez-Calleja^a,
Cristina Nerín^b, María-Luisa García-López^{a,*}

^a Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, E-24071 León, Spain

^b Department of Analytical Chemistry I3A, University of Zaragoza, Campus Rio Ebro, Maria de Luna 3, 50018 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2013

Received in revised form

4 February 2014

Accepted 11 February 2014

Available online 22 February 2014

Keywords:

Antimicrobial active food packaging

E. coli O157:H7

Sheep cheese

Oregano essential oil

Ethyl lauroyl arginate

LAE

ABSTRACT

The antimicrobial activity of two packaging films (polypropylene – PP- and polyethylene terephthalate – PET-) coated with different concentrations (0, 4, 6 and 8%) of essential oil from *Origanum vulgare* (OR) and Ethyl Lauroyl Arginate HCl (LAE) was tested against two *Escherichia coli* O157:H7 strains using *in vitro* systems and a raw milk sheep cheese model (Zamorano). The influence of the antimicrobials on the sensory attributes of cheese was also evaluated. For both strains, the MBC (minimum bactericidal concentration) values were identical to their respective MIC (minimum inhibitory concentration) values and lower for LAE (25 mg/l) than for OR (200–400 mg/l). PP and PET films coated with OR were tested by a vapour phase assay and the Japanese Standard method (JIS Z 2801:2000). Both films coated with LAE were tested by an agar diffusion method. Overall, *in vitro* tests were effective against both strains. The inhibitory activity depended on the active compound concentration, the target strain and the packaging material, PET being more effective than PP. For inoculated cheese slices, OR and LAE PP films did not effectively decrease *E. coli* O157:H7 counts after 7-days cold storage. PET films incorporating 6 and 8% of OR and LAE significantly ($p < 0.05$) decreased the numbers of both strains and also did 4% for the reference and wild strain depending on the antimicrobial. LAE PP, OR PET and LAE PET did not significantly ($p > 0.05$) affect sensorial characteristics of Zamorano cheese. Packaging with PET films coated with $\geq 6\%$ LAE concentrations might be useful in reducing *E. coli* O157:H7 numbers in sheep cheese.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pathogenic *Escherichia coli* strains are categorised into six specific groups or pathotypes based on their virulence determinants. One of them is enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), which is considered a subset of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) also named verocytotoxic-producing *E. coli* (VTEC) (Nataro & Kaper, 1998). Although several STEC serotypes can cause serious human illness and are recognised as EHEC, serotype O157:H7 is an important food borne pathogen and the predominant cause of EHEC-associated disease worldwide. In humans, low numbers (10–100 cells) of serotype O157:H7 strains can cause severe illnesses such as diarrhoea and haemorrhagic colitis (HC) that may progress into a life-

threatening sequel called haemolytic uremic syndrome (HUS), especially in young children and the elderly. HUS is the most common cause of acute renal failure in young children and an important cause of morbidity and mortality in the elderly (Meng, Lejeune, Zhao, & Doyle, 2013).

The main reservoir of this pathogen appears to be wild and domestic ruminants such as deer, cattle, goats and sheep (Ferenš & Hovde, 2011). In addition to undercooked beef hamburgers and other meat products, as well as water, fruits and vegetables, cheeses made from raw milk have been implicated in infections of *E. coli* O157:H7 (Espié et al., 2006; Farrokh et al., 2013). The occurrence of EHEC strains in sheep cheeses and raw sheep milk dedicated to cheesemaking has been reported by a number of authors in Spain and also in other countries (Caro & García-Armesto, 2007; Caro, Mateo, Rúa, & García-Armesto, 2011; Farrokh et al., 2013; Rey et al., 2006). Ewes' breeding is an important activity in Spain (ca. 22% of the EU), which is concentrated particularly in the inner regions. According to the Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment (<http://>

* Corresponding author. Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, E-24071 León, Spain. Tel.: +34 987 291 119; fax: +34 987 291 284.

E-mail address: mlgarl@unileon.es (M.-L. García-López).

www.magrama.gob.es; last accessed 30 July 2013), the Castilla y León region is the first producer of ewes' milk, with more than 50% of the Spanish production, most of this production being dedicated to manufacturing of raw sheep milk cheeses such as Zamorano cheese.

Active packaging has been defined as packaging which performs some desired functions other than merely providing a barrier to the external environment (Rooney, 2005). According to Commission Regulation (EC) No 450/2009 (European Commission, 2009), "active materials and articles means materials and articles that are intended to extend the shelf-life or to maintain or improve the condition of packaged food; they are designed to deliberately incorporate components that would release or absorb substances into or from the packaged food or the environment surrounding the food".

Antimicrobial packaging is a form of active food packaging which is beneficial to the consumers as well as to the food industry since it can extend product shelf-life and/or maintain food safety by killing or reducing the growth rate of target microorganisms. Several antimicrobial agents could be incorporated into conventional food packaging systems (Cha & Chinnan, 2004; López, Sánchez, Batlle, & Nerín, 2007a; Nerin, 2012; Suppakul, Miltz, Sonneveld, & Bigger, 2003) including chemical agents, natural agents and probiotics (Han, 2005). A number of these compounds has been proposed and tested for antimicrobial activity in food packaging including oregano essential oil (OR) and Ethyl Lauroyl Arginate HCl (LAE). Antimicrobial films with OR and LAE have been tested against some *Salmonella* serovars, *Listeria monocytogenes* and sometimes against a non pathogenic *E. coli* strain in an infant milk formula (Muriel-Galet, López-Carballo, Gavara, & Hernández-Muñoz, 2012b), packaged salads (Muriel-Galet, Cerisuelo, López-Carballo, Lara, Gavara, & Hernández-Muñoz, 2012a) and cooked sliced ham (Theinsathid, Visessanguan, Krueate, Kingcha, & Keeratipibul, 2012). However, information on the effect of packaging films coated with OR or LAE on the behaviour of strains belonging to the pathogenic serotype *E. coli* O157:H7 is not available.

This study was undertaken to evaluate the anti-*E. coli* O157:H7 activity of two packaging films coated with different concentrations of OR and LAE. The activity was studied by *in vitro* tests and also by direct contact with artificially contaminated samples of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano cheese). The effects of the antimicrobials on the sensory attributes of cheese were also studied.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Two strains of *E. coli* O157:H7 were used: non pathogenic strain CECT (Spanish Type Culture Collection) 5947 and strain M364VO isolated by us from a tank of sheep milk in a farm in Castilla y León (Spain). The latter strain carried the *stx2* and *eae* genes.

Both strains were stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Nutrient Broth (NB, Scharlab, Barcelona, Spain) with 40% Glycerol. Subcultures were grown overnight in Tryptone Soya Broth (TSB, Scharlab) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. Antimicrobial compounds

Oregano essential oil obtained from *Origanum vulgare* L (OR; Chemical Abstracts Service (CAS) Registry Number 8007-11-2), supplied by Argolide Química SL (Barcelona, Spain), and Ethyl Lauroyl Arginate HCl (LAE; CAS Registry Number 60372-77-2), supplied by Lamirsa (Barcelona, Spain), were used.

2.3. Active films

The coating technology used to produce the active materials was a process protected by the European Patent EP1657181 (Nerín &

Garcés, 2006). The active films were manufactured and supplied by the Spanish company ARTIBAL S.A. (Sabiñánigo, Spain). They consisted of coating layers with known concentrations of OR (4, 6 and 8%) and LAE (4, 6 and 8%). The plastic film PET (polyethylene terephthalate) was $23\text{ }\mu\text{m}$ thick with a density of $18.73 \pm 0.02\text{ g/m}^2$. The PP (polypropylene) film was $40\text{ }\mu\text{m}$ thick. The active films contained the antimicrobial compounds expressed as a percentage of weight active agent/weight wet active layer. ATOX (active coating) and ACRIL (acrylic antimicrobial coating) are the industrial denominations of varnishes. The gramage of the coating was in all cases 4 g/m^2 .

2.4. Antimicrobial susceptibility assays

2.4.1. Broth dilution assays

A broth dilution assay was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) for both OR and LAE (Becerril, Gomez-Lus, Goni, Lopez, & Nerin, 2007).

2.4.1.1. OR. Serial two-fold dilutions, between 2.5 and 160 mg/ml, were made in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma–Aldrich Química, S.A., Madrid, Spain) (Sacchetti et al., 2005). Then, $10\text{ }\mu\text{l}$ aliquots were added to 890 μl of TSB (Scharlab) plus 0.6% Yeast Extract (Scharlab) (TSBYE), and inoculated with 100 μl of the bacterial suspensions ($ca. 10^6\text{ cfu/ml}$) in TSBYE. The OR final concentrations ranged from 0.025 to 1.6 mg/ml. To determine whether DMSO would be inhibitory to the bacteria, controls with 10 μl of the solvent instead of OR dilutions were performed for both strains. The cultures were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h while shaking. The bacterial growth was determined by measuring the optical density at 625 nm. Samples (100 μl) were also taken and serial dilutions were plated on Tryptone Soya Agar (TSA, Scharlab) and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h.

2.4.1.2. LAE. Serial two-fold dilutions, between 1.25 and 160 mg/ml were made in sterile distilled water and tested as above (LAE final concentrations ranged from 0.0125 to 1.6 mg/ml), cultures being incubated without shaking.

MIC was defined as the lowest concentration of antimicrobials at which bacterial growth was not detected. The MBC was the lowest concentration of antimicrobials at which bacteria failed to grow in TSBYE and were not cultured after plating onto TSA. Both were expressed as mg of antimicrobials per l. Tests were performed in triplicate.

2.4.2. Vapour phase assay

The vapour phase activity between OR incorporated in the packaging materials and both *E. coli* strains was tested. Tests were carried out in triplicate by inoculating TSA plates with 100 μl of TSBYE containing 10^6 cfu/ml of each organism. The Petri dish covers were replaced by the active films as described by López, Sánchez, Batlle, and Nerín (2007b) and the growth examined after incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Controls with PP and PET without active compounds were also tested. When the growth of the target strains covered by the active films was compared with that of the controls, the antimicrobial effect of the atmosphere derived from the different concentrations of OR was categorised as: –, no inhibition; +, partial inhibition and ++, total inhibition.

2.4.3. Direct contact assays

2.4.3.1. OR. The Japanese Industrial Standard method JIS Z 2801:2000 (Anonymous, 2000) was used to evaluate the antibacterial activity of the active films by direct contact. Briefly, three pieces ($50 \times 50\text{ mm}$) of each test film coated with 4, 6 and 8% of OR were placed, with the active surface up, on Petri dishes, inoculated

with 400 µl of bacterial suspensions (ca. 10⁵ cfu/ml) and covered with 40 × 40 mm pieces of uncoated sterile PP and PET films. Six untreated subsamples of each film (coated only with the varnish) were processed as above. Half of them were used for the determination of the initial cell count directly after inoculation. After incubation for 24 h at 37 °C, the bacteria were harvested from the films surfaces using 10 ml of Buffered Peptone (Scharlab), which was serially diluted and plated on TSA. After 24 h at 37 °C, the antimicrobial activity was expressed as the *R* value. The *R* value was calculated using the formula $R = \log(B/C)$ where, B: average of colony forming units (cfu) on the untreated films and C: average of the cfu found on the treated ones.

2.4.3.2. LAE. Since the JIS method could not be used for LAE, the evaluation of the antibacterial activity of this compound by direct contact was carried out using samples of coated PP and PET films (4, 6 and 8% of LAE) and an agar diffusion method as described by Iseppi et al. (2008). The varnish (ACRIL) coat weight was 4 g/m². The coated films (40 × 40 mm) were placed onto TSA (Oxoid) plates seeded with 10⁸ cfu/ml from overnight TSBYE (Scharlab) cultures. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and the antagonistic activity was quantified by a clear zone of inhibition in the indicator lawn around and in contact with the coated plastic film. Films coated with varnish not containing LAE were also tested as negative controls.

2.5. Antimicrobial activity in Zamorano sheep cheese

Because of the source of strain ECVT M364VO, wedges of commercial Spanish Zamorano cheese were used. Zamorano cheese is a hard cheese, made with the milk of the Churra and Castilian sheep breeds.

Commercial cheese wedges, prepared for an estimated domestic consumption of a week, were purchased and sliced. The slices were contaminated on the surface by dipping in a 10⁶ cfu/ml TSBYE broth to achieve final levels of ca. 10⁴ cfu/g. Control and contaminated cheese slices were placed between two pieces of PP or PET films coated with the varnish alone and three different concentrations of each antimicrobial (4, 6, and 8%). Slices were then placed in uncoated PP bags and stored at 3 °C to reflect domestic storage conditions. Numbers of the *E. coli* O157:H7 strains were counted, just after inoculation, and after one and seven storage days on MacConkey Agar with Sorbitol (SMAC, Scharlab) after 24 h incubation at 37 °C. Each experiment was performed six times.

2.6. Statistical analysis of data on Zamorano sheep cheese

E. coli counts were transformed and expressed as log cfu/g. Basic descriptive statistics of each parameter (mean and standard deviation) were calculated and linear regression analysis was used to determine the relationship between parameters. The potential influence of strain, film, antimicrobial and storage day was analysed by using multi-factor analysis of variance (ANOVA). Subsequently, *post-hoc* pairwise comparisons were performed through the Fisher Least Significant Difference (Fisher-LSD) test. Data analysis was carried out with the "Statistica for Windows release 7.0" software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.7. Sensory analysis

A panel of 10 members was recruited for evaluating the effect of the coated films on the smell and taste of non contaminated Zamorano cheese. All were selected on the basis of commitment and motivation. Panellists were asked to rank the samples in descending order based on overall acceptability. Control and wrapped cheese

Table 1

MIC^a and MBC^b values for two *E. coli* O157:H7 strains in broth dilution assays.

Antimicrobial activity	OR ^c		LAE ^d	
	Strain M364VO ^e	Strain CECT ^f 5947	Strain M364VO	Strain CECT 5947
MIC (mg/l)	400	200	25	25
MBC (mg/l)	400	200	25	25

^a Minimum inhibitory concentration.

^b Minimum bactericidal concentration.

^c Oregano essential oil obtained from *Origanum vulgare*.

^d Ethyl Lauroyl Arginate HCl.

^e Strain from sheep milk.

^f CECT, Spanish Type Culture Collection.

samples (PP with 4, 6 and 8% OR; PP with 4, 6 and 8% LAE; PET with 4, 6 and 8% OR; and PET with 4, 6 and 8% LAE) were analysed after one and seven days of chilled storage in four different sampling days. Data were analysed and interpreted using the Friedman test according to ISO standard 8587:2006 (Anonymous, 2006, 2013).

3. Results and discussion

3.1. Determination of MIC and MBC values against *E. coli* O157:H7

The MIC and MBC values of OR and LAE for both *E. coli* O157:H7 strains are given in Table 1. MBC values of each compound were identical to their respective MICs. Similar data were reported by Becerril et al. (2007) for OR against the non-STEC strain *E. coli* ATCC 25922 (MIC and MBC values of 190 mg/l). For one *E. coli* O157:H7 strain, the OR MIC and MBC values were 625 µl/l (Burt & Reinders, 2003). In this study, LAE showed stronger antibacterial activity than OR, the latter being two-fold more efficient against the reference culture than against the sheep milk strain. For LAE, the MIC and MBC values found by Muriel-Galet et al. (2012b) against the non-STEC strain *E. coli* ATCC 25922 were 20 and 32 ppm, respectively.

The high antimicrobial activity of LAE on Gram-negative bacteria has been attributed to alterations which involve both the cytoplasm membrane and the external membrane without causing cellular lysis (Rodríguez, Seguer, Rocabayera, & Manresa, 2004). Among a number of plant essential oils, essential oil from *O. vulgare* has been found to exhibit the strongest *in vitro* bacteriostatic and bactericidal activities against non-verotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* O157:H7 strains (Burt & Reinders, 2003; Marino, Bersani, & Comi, 2001).

3.2. Vapour phase assay

Table 2 shows the inhibitory effect of the atmosphere derived from OR incorporated in the packaging materials (PP and PET). Oregano essential oil did not inhibit the growth of both *E. coli* O157:H7 strains under 4%, but did under 6% (partial inhibition) and 8% (partial or total inhibition). A number of studies (Becerril et al., 2007; Gutiérrez, Batlle, Sánchez, & Nerín, 2010; López et al., 2007b; Rodríguez, Nerín, & Batlle, 2008) has reported that, in the vapour phase assays, the antimicrobial activity of active packaging containing essential oils (EOs) is produced by the volatile compounds present in the headspace of the Petri dish and the amount of active compounds present in the agar. For oregano essential oil, these compounds have been mainly identified as the phenolic compounds carvacrol and thymol although minor components appear to play a significant role (Burt, 2004; Gutiérrez et al., 2010).

The effectiveness of EOs incorporated into packaging materials tested by vapour phase assay has been related to the concentration of the active compound, the packaging material and the target

Table 2
Antimicrobial effect of the atmosphere derived from different concentrations of OR incorporated in two packaging films against two *E. coli* O157:H7 strains.

Films	Strain M364VO ^a	Strain CECT 5947 ^b
0% OR ^c PP ^d	– ^e	–
0% OR PET ^f	–	–
4% OR PP	–	–
4% OR PET	–	–
6% OR PP	+	+
6% OR PET	+	+
8% OR PP	++	++
8% OR PET	+	++

^a Strain from sheep milk.

^b CECT, Spanish Type Culture Collection.

^c Oregano essential oil obtained from *Origanum vulgare*.

^d PP, Polypropylene.

^e –, no inhibition; +, partial inhibition; ++, total inhibition.

^f PET, Polyethylene terephthalate.

microorganism (Gutiérrez et al., 2010; López et al., 2007b; Rodríguez et al., 2008). In this study, higher concentrations of OR in the active coatings resulted in higher antimicrobial activity, 6% OR being the minimum concentration showing inhibition against both *E. coli* O157:H7 strains. At 8% OR, differences were observed between PP and PET. Thus, total inhibition by 8% OR PP was observed against both *E. coli* O157:H7 strains while 8% OR PET completely inhibited only *E. coli* O157:H7 reference strain. Testing the behaviour of different films, Gutiérrez et al. (2010) concluded that a critical point in the design of an active packaging is the material used because not only the concentration of the active compound, but also the kinetic of release and the polymer play an important role since it is necessary to reach a minimum concentration of the active compounds in the solid medium during the lag phase of the microorganisms to inhibit their growth, and this occurs faster with certain active polymers. Overall, EOs are more effective against moulds and yeasts than against bacteria and among the latter, they appear to be more efficient against Gram-

positive species (Burt, 2004). In addition, it has been reported that target microorganisms have a clear influence on the composition of the atmospheres generated by EOs. This finding has been attributed to diverse interactions and/or biotransformation routes (López et al., 2007b).

3.3. Direct contact assays

Table 3 gives the quantitative antimicrobial activity of PP and PET films coated with ATOX varnish containing different concentrations of OR and tested under the JIS Z 2801:2000 method (Anonymous, 2000). This standard was developed to measure the antibacterial activity of antibacterial-treated plastic products and other non-porous materials. In this study, the OR PET film coated with 4, 6 and 8% of the antimicrobial compound did not allow recovering of cultivable cells from both *E. coli* O157:H7 strains after 24 h incubation at 37 °C. These results demonstrate that the OR-containing PET films had a strong antibacterial *in vitro* direct contact activity against both *E. coli* O157:H7 strains. Evaluation of PP films with ATOX varnish coating containing OR showed that 6 and 8% OR also completely inhibited the *E. coli* O157:H7 type strain, which under 4% OR, had a *R* value of 0.20 (a reduction of 38%). However, for the milk strain *E. coli* O157:H7 M364VO, the PP films containing 4 and 6% OR allowed *E. coli* O157:H7 growth (*R* values of –0.41 and –0.23, respectively) although under OR concentrations of 8% produced a reduction of 91.7% (*R* value = 1.08).

Our results show that by using the JIS Z 2801:2000 method, the OR PET films were more efficient than the OR PP films, the behaviour of the latter depending on the origin of the tested strain and the concentration of the active compound.

Table 4 shows the antimicrobial activity of LAE incorporated in the ACRIL varnish coating PP and PET films. No activity was observed against the tested strains at 0 and 4% LAE. Results obtained with 0% LAE PP and 0% LAE PET films suggest that, under the conditions of this test (incubation at 37 °C), manipulations required to prepare coated films without LAE did not affect the antibacterial

Table 3
Antimicrobial activity tested by a direct contact assay^a of different concentrations of OR^b (4, 6 and 8%) incorporated in two packaging films against two *E. coli* O157:H7 strains.

Strain	Film	OR concentration	Film control after inoculation (cfu/ml)	Film control after 24 h (cfu/ml)	Coated films after 24 h (cfu/ml)	<i>R</i> value ^c
M364VO ^g	PP ^f	Varnish ATOX ^d	1.02 × 10 ^{5e}	5.40 × 10 ⁶		
		4%			1.40 × 10 ⁷	–0.41
		6%			9.20 × 10 ⁶	–0.23
		8%			4.47 × 10 ⁵	1.08
	PET ⁱ	Varnish ATOX	1.90 × 10 ⁵	7.00 × 10 ⁴		
		4%			NG ^h	
6%		NG				
CECT ^j 5947	PP	Varnish ATOX	1.33 × 10 ⁵	1.50 × 10 ⁷		
		4%			9.43 × 10 ⁶	0.20
		6%			NG	
		8%			NG	
	PET	Varnish ATOX	1.57 × 10 ⁵	1.20 × 10 ⁵		
		4%			NG	
6%		NG				
		8%		NG		

^a Activity tested by using Japanese standard JIS Z 2801:2000.

^b Oregano essential oil obtained from *Origanum vulgare*.

^c *R* value was calculated using the formula $R = \log(B/C)$ where, *B*: average of colony forming units (cfu) on the untreated films and *C*: average of the cfu found on the treated ones after 24 h incubation at 37 °C.

^d Films coated only with the varnish (0% OR).

^e The values are means for counts obtained for three independent sample pieces.

^f PP, Polypropylene.

^g Strain from sheep milk.

^h NG, no growth. Viable cells were not recovered from the inoculated coated films after 24 h incubation at 37 °C.

ⁱ PET, Polyethylene terephthalate.

^j CECT, Spanish Type Culture Collection.

Table 4
Antimicrobial activity tested by a direct contact assay^a of different concentrations of LAE incorporated in two packaging films against two *E. coli* O157:H7 strains.

Strain	Film	LAE ^b concentration	Inhibition zone (mm) ^c
M364VO ^f	PP ^e	Varnish ACRIL ^d	0
		4%	0
		6%	1
		8%	2.5
	PET ^g	Varnish ACRIL	0
		4%	0
		6%	1.5
		8%	2.5
CECT ^h 5947	PP	Varnish ACRIL	0
		4%	0
		6%	1
		8%	2.5
	PET	Varnish ACRIL	0
		4%	0
		6%	1.5
		8%	2.5

^a Activity tested by using an agar diffusion method as described by Iseppi et al. (2008).

^b Ethyl Lauroyl Arginate HCl.

^c Clear zone of inhibition around the plastic film.

^d Films coated only with the varnish (0% LAE).

^e PP, Polypropylene.

^f Strain from sheep milk.

^g PET, Polyethylene terephthalate.

^h CECT, Spanish Type Culture Collection.

activity of the coated films. The activity, which was revealed by a clear zone of inhibition under and around the active films (between 1 and 2.5 mm) demonstrated that 6% LAE PET films were more efficient than 6% LAE PP films although 8% LAE PET and 8% LAE PP films gave identical results (2.5 mm of inhibition zone).

As observed with the vapour phase assay, results obtained with the direct contact assays appear to depend on the packaging materials, the concentration of the active compound and the target microorganism.

Table 5
Effects of two antimicrobial packaging films against two *E. coli* O157:H7 strains inoculated on slices of Zamorano cheese.

Film	Antimicrobial	Concentrations	<i>E. coli</i> O157:H7 strain M364VO ^a			<i>E. coli</i> O157:H7 strain CECT ^b 5947			
			Day 0	Day 1	Day 7	Day 0	Day 1	Day 7	
PP ^c	OR ^d	Varnish ATOX	e,f 4.37 ± 0.11 ^{1,2}	4.42 ± 0.06 ¹	4.26 ± 0.14 ²	4.33 ± 0.10 ¹	4.37 ± 0.19 ¹	4.44 ± 0.09 ¹	
		0%	4.31 ± 0.13 ¹	4.26 ± 0.07 ¹	4.07 ± 0.15 ²	4.40 ± 0.06 ¹	4.19 ± 0.07 ²	3.95 ± 0.12 ³	
		4%	4.32 ± 0.21 ^{1,2}	4.35 ± 0.18 ¹	4.18 ± 0.25 ²	4.38 ± 0.17 ^{1,2}	4.48 ± 0.06 ¹	4.32 ± 0.07 ²	
		8%	4.16 ± 0.13 ¹	4.23 ± 0.17 ¹	4.16 ± 0.11 ¹	4.36 ± 0.09 ¹	4.13 ± 0.08 ²	4.30 ± 0.35 ¹	
	LAE ^g	Varnish ACRIL							
		0%	4.41 ± 0.09 ¹	4.30 ± 0.08 ^{1,2}	4.22 ± 0.06 ²	4.30 ± 0.11 ¹	4.29 ± 0.07 ¹	4.28 ± 0.12 ¹	
		4%	4.23 ± 0.05 ¹	4.12 ± 0.21 ¹	4.24 ± 0.03 ¹	4.33 ± 0.20 ^{1,2}	4.37 ± 0.10 ¹	4.19 ± 0.11 ²	
		6%	4.47 ± 0.12 ¹	4.25 ± 0.13 ²	4.22 ± 0.14 ²	4.44 ± 0.08 ¹	4.30 ± 0.08 ^{1,2}	4.24 ± 0.12 ²	
	PET ^h	OR	Varnish ATOX						
			0%	4.44 ± 0.07 ¹	4.44 ± 0.05 ¹	4.38 ± 0.04 ¹	4.50 ± 0.09 ¹	4.32 ± 0.09 ²	4.31 ± 0.14 ²
			4%	4.21 ± 0.03 ^{1,2}	4.12 ± 0.05 ¹	4.29 ± 0.17 ²	4.45 ± 0.07 ¹	4.28 ± 0.15 ²	3.99 ± 0.15 ³
			6%	4.46 ± 0.22 ¹	4.39 ± 0.19 ¹	4.07 ± 0.04 ²	4.53 ± 0.14 ¹	4.42 ± 0.07 ¹	4.23 ± 0.15 ²
LAE		Varnish ACRIL							
		0%	4.29 ± 0.14 ¹	4.26 ± 0.12 ¹	4.01 ± 0.04 ²	4.36 ± 0.15 ¹	4.26 ± 0.17 ¹	4.11 ± 0.09 ²	
		4%	4.35 ± 0.09 ^{1,2}	4.39 ± 0.03 ¹	4.21 ± 0.09 ²	4.32 ± 0.07 ¹	4.30 ± 0.16 ¹	4.21 ± 0.26 ¹	
		6%	4.30 ± 0.09 ¹	4.27 ± 0.04 ¹	4.12 ± 0.25 ²	4.35 ± 0.05 ^{1,2}	4.43 ± 0.14 ¹	4.21 ± 0.15 ²	
	8%	4.47 ± 0.03 ¹	4.22 ± 0.10 ²	4.13 ± 0.16 ²	4.44 ± 0.09 ¹	4.32 ± 0.06 ¹	4.17 ± 0.16 ²		
	8%	4.50 ± 0.07 ¹	4.23 ± 0.17 ²	4.30 ± 0.05 ²	4.44 ± 0.08 ¹	4.40 ± 0.12 ^{1,2}	4.28 ± 0.09 ²		

^a Strain from sheep milk.

^b CECT, Spanish Type Culture Collection.

^c PP, Polypropylene.

^d Oregano essential oil obtained from *Origanum vulgare*.

^e Each mean ± standard deviation represents an average of six determinations.

^f Means on the same line with different superscript numbers are significantly different ($p < 0.05$).

^g Ethyl Lauroyl Arginate HCl.

^h PET, Polyethylene terephthalate.

3.4. Antimicrobial activity in Zamorano sheep cheese

The change in numbers of the *E. coli* O157:H7 strains during cold storage of inoculated Zamorano cheese slices placed between two pieces of PP or PET films coated with the varnishes alone and three different concentrations of each antimicrobial (4, 6, and 8%) is given in Table 5. Statistical analysis demonstrated that counts were significantly ($p < 0.05$) affected by the film, the antimicrobial compound, the storage day and the tested strain.

After seven days of cold storage, 4% OR PP films significantly ($p < 0.05$) decreased numbers of both *E. coli* O157:H7 strains. PP films coated with 6 and 8% OR did not significantly ($p > 0.05$) reduce the counts. Overall, these results are not in agreement with data obtained with the *in vitro* tests (vapour phase assay and JIS Z 2801:2000 method) where the inhibition of the PP films increased with increasing OR concentrations (Tables 2 and 3).

In the cheese model, LAE PP films were only statistically significantly efficient ($p < 0.05$) in reducing *E. coli* O157:H7 numbers when coated with 6% although the highest inhibition zones in the *in vitro* direct contact assay was obtained with 8% LAE PP films. The slight statistically significant decreases in cheese models (Table 5) when stored under 4% OR PP and 6% LAE PP films at 3 °C may be regarded as so small that they may not reflect meaningful inhibition. These data suggest that using PP antimicrobials food packaging films based on the release of OR and LAE, do not appear to be efficient against the target *E. coli* O157:H7 strains inoculated in Zamorano cheese. When the application of packaging films based on the release of LAE and OR from a number of films was studied against other Gram-negative pathogenic mesophilic strains (*Salmonella*) inoculated in food models, the reduction reported was much higher (Muriel-Galet et al., 2012a; Muriel-Galet et al., 2012b).

Data obtained with PET films coated with OR show that they significantly ($p < 0.05$) reduced levels of the tested strains when coated with 4% (type strain), and 6 and 8% (both strains). Similar results were observed for PET films coated with LAE although for 4% LAE, the significant ($p < 0.05$) reduction was for the milk strain. It

should be noted that 6% OR and 6% LAE PET were more efficient than 8% OR and 8% LAE PET. Overall, in the Zamorano cheese model, the antimicrobial capacity of PET films was greater than that of PP films.

When studying the effectiveness of antimicrobial food packaging films, many antimicrobial systems that have shown strong activity when tested on model systems, do not demonstrate similar activity when tested in real food products. This, which is very common, is due not only to the target microorganisms but also to the interactive effects of a number of factors (Han, 2005). Amongst them are characteristics of the food such as pH, a_w , fat and protein content, antioxidants, preservatives, salt and other additives and also extrinsic determinants such as the storage temperature and the atmosphere composition. Moreover, each food has its own characteristic microflora (Burt, 2004; Han, 2005; Quintavalla & Vicini, 2002). The average physicochemical composition of Zamorano cheese wedges was: fat over dry matter, 45%; protein, 25%; pH 5.3; a_w , 0.95 and NaCl content, 1.94%. The dominant microflora, which is lactic acid bacteria, was over 9 log units cfu/g. It should be noted that although *E. coli* O157:H7 strains are mesophilic bacteria unable to grow under 7 °C some strains appear to possess unique genetic mechanisms enabling survival and proliferation under low temperature conditions (Vidovic, Mangalappalli-Illathu, & Korber, 2011).

3.5. Sensory analysis

The value of the correlated Friedman statistic was $F' = 12.59$. For OR PP films, at 5% level of significance, the Friedman's test showed significant differences among samples ($F' = 48.58$). The pairwise comparison for control samples and those packaged with OR–PP films showed significant differences ($p < 0.05$) after 24 h storage and also after seven days storage under 6% OR. No significant differences ($p > 0.05$) were established between OR PP packages of cold stored cheese slices kept for 24 h and seven days. The results indicate that for OR PP, panellists detected the OR flavour after 24 h and to a lesser extent after seven days storage. Panellists did not find significant differences ($p > 0.05$) for cheese slices packaged with LAE PP ($F' = 7.21$) neither for OR PET ($F' = 9.70$) and LAE PET ($F' = 12.3$). Our data suggest that LAE and/or PET did not significantly affect sensorial characteristics of Zamorano cheese.

In conclusion, overall, the *in vitro* tests demonstrated the antimicrobial activity of PP and PET films coated with OR and LAE when tested against a wild and a reference *E. coli* O157:H7 strains although the effect on the food model (Zamorano cheese) was moderately effective and most depend on the film and also on the antimicrobial agent. Our data suggest that PET films coated with $\geq 6\%$ LAE concentrations might be useful in reducing *E. coli* O157:H7 numbers in sheep cheese.

Acknowledgements

Verónica Otero was beneficiary of a grant from the FPU program of the Spanish Government. This work was financed by Junta de Castilla y León (Ayuda Grupo de Excelencia GR155) and partially by the Junta project LE331A12-2 and also by the project AGL2011-26118/ALI of the Spanish R&D program. We are grateful for the valuable collaboration of Artibal S.A. (Sabiñánigo, Huesca, Spain). Thanks are also given to the Gobierno de Aragón and Fondo Social Europeo for financial help given to GUIA research Group T-10.

References

Anonymous. (2000). JIS Z 2801:2000. Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Standards Association.

- Anonymous. (2006). ISO 8587:2006. Sensory analysis. Methodology. Ranking. International Organization for Standardization.
- Anonymous. (2013). ISO 8587:2006/Amd 1:2013. Sensory analysis. Methodology. Ranking. International Organization for Standardization.
- Becerril, R., Gomez-Lus, R., Goni, P., Lopez, P., & Nerin, 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*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(5–6), 1003–1011.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Burt, S. A., & Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 162–167.
- Caro, I., & García-Armesto, M. R. (2007). Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 116(3), 410–413.
- Caro, I., Mateo, J., Rúa, J., & García-Armesto, M. R. (2011). Occurrence of *Escherichia coli* O157, O111 and O26 in raw ewe's milk and performance of two enrichment broths and two plating media used for its assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 84–87.
- Cha, D. S., & Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 223–237.
- Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., et al. (2006). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection*, 134(1), 143–146.
- European Commission. (2009). Commission regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*, L135, 3–11.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., et al. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 190–212.
- Ferens, W. A., & Hovde, C. J. (2011). *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4), 465–487.
- Gutiérrez, L., Batlle, R., Sánchez, C., & Nerin, C. (2010). New approach to study the mechanism of antimicrobial protection of an active packaging. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(9), 1063–1069.
- Han, J. H. (2005). Introduction to active food packaging technologies. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging* (pp. 80–107). London: Academic Press.
- Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhäusern, S., Guerrieri, E., et al. (2008). Anti-Listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 281–287.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2007a). Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8814–8824.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2007b). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4348–4356.
- Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 187–195.
- Meng, J., Lejeune, J. T., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In M. P. Doyle, & R. L. Buchanan (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 287–310). Washington, DC: ASM Press.
- Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., López-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012a). Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 195–201.
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012b). Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 239–244.
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201.
- Nerin, C. (2012). Essential oils in active packaging. In L. Valgimigli (Ed.), *Essential oils as natural food additives: Composition, applications, antioxidant and antimicrobial properties* (pp. 397–412). Nova Science Inc.
- Nerin, C., & Garcés, O. (2006). *Antimicrobial packaging based on the use of natural extracts and the process to obtain this packaging*. European Patent Application EP 1 657 181 A1.
- Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62(3), 373–380.
- Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J. E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., et al. (2006). Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 212–217.
- Rodríguez, A., Nerin, C., & Batlle, R. (2008). New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6364–6369.
- Rodríguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X., & Manresa, A. (2004). Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, N²-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 903–912.

- Rooney, M. L. (2005). Introduction to active food packaging technologies. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging* (pp. 63–79). London: Academic Press.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., et al. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621–632.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, 68(2), 408–420.
- Theinsathid, P., Visessanguan, W., Kruenate, J., Kingcha, Y., & Keeratipibul, S. (2012). Antimicrobial activity of lauric arginate-coated polylactic acid films against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on cooked sliced ham. *Journal of Food Science*, 77(2), M142–M149.
- Vidovic, S., Mangalappalli-Illathu, A. K., & Korber, D. R. (2011). Prolonged cold stress response of *Escherichia coli* O157 and the role of rpoS. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 163–169.

1 **Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bulk tank ewes' milk**
2 **and sheep farm environment.**

3

4 Verónica Otero (votear@unileon.es)^a, Sergio Sánchez (sergio.sanchez@isciii.es)^b, Silvia
5 Herrera-León (sherrera@isciii.es)^b, José-María Rodríguez-Calleja (jm.rcalleja@unileon.es)^a,
6 Andrés Otero (andres.otero@unileon.es)^a, María-Luisa García-López (mlgarl@unileon.es)^a,
7 Jesús A. Santos (j.santos@unileon.es)*^a

8 ^aDepartment of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of
9 León, Spain

10 ^bLaboratorio de Enterobacterias, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de
11 Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Madrid, Spain

12

13 *Corresponding author

14 Jesús A. Santos

15 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

16 Facultad de Veterinaria, Universidad de León

17 E-24071-León, Spain

18 Phone: +34 987 291 119

19 Fax: +34 987 291 284

20 Email: j.santos@unileon.es

21

22

23

24 **Abstract**

25 The aims of this study were to evaluate the prevalence of Shiga toxin-producing
26 *Escherichia coli* (STEC) in bulk tank ewes' milk and farm environment in Castilla y León
27 (Northwest Spain) and to characterize the isolates obtained to gain information on reservoirs
28 and sources of contamination. Also, a commercial immunoassay for detection of Shiga
29 toxins was tested to evaluate its possible usefulness for ewes' milk analysis.

30 A total of 388 milk samples and samples from air, water, feed and faeces from 10
31 farms were examined by PCR. *stx* genes were detected in 176 (45.36 %) milk samples, 9 (45
32 %) water samples and 5 (25 %) faeces samples. A total of 62 isolates were obtained, four of
33 them belonging to serotype O157:H7 (three from milk samples and one from water
34 samples). All the samples of bulk tank milk tested with the immunoassay yielded negative
35 results.

36 In conclusion, Spanish bulk tank ewes' milk can constitute a source of STEC, but the
37 overall prevalence of serotypes involved in human disease is low. The environment of the
38 dairy farm may represent an important reservoir of this microorganism, particularly drinking
39 water.

40

41 **Keywords:** Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC; sheep milk; *E. coli* O157:H7

42

43

44 **1. Introduction**

45 Pathogenic *Escherichia coli* are regarded as emerging human pathogens. Among
46 them, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are the agents of severe diseases in humans,
47 such as haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome (HUS) (Meng, et al., 2013).
48 The main virulence factor in STEC is the production of Shiga toxin (Stx) 1 and Stx 2 or the
49 several variants described of those toxins, but pathogenic strains usually produce other
50 factors, such as intimin or enterohaemolysin, which are involved in the pathogenicity by
51 mediating in the attachment of STEC to cell membranes and in the inflammatory response,
52 respectively (Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton, 1998b). Strains belonging to
53 serotype O157:H7 are of special relevance, because of the high virulence, but other non-
54 O157 STEC serotypes are also of concern because of their implication in foodborne human
55 disease, the O104 being a recent example of an emerging serotype involved in large
56 outbreaks (Grad, et al., 2012; Johnson, et al., 2006; Scheutz, et al., 2011).

57 Cattle and other ruminants, as sheep and goat, are considered the main reservoir of
58 STEC, which is transmitted to human via contaminated foods (meat, milk and derived
59 products), but a variety of foods of animal and plant origin have been incriminated in
60 foodborne outbreaks as well (Blanco, et al., 2003a; Karmali, et al., 2010; Meng, et al.,
61 2013). Detection of STEC in foods is difficult to achieve, taking into account the diversity of
62 phenotypic characteristics of the strains involved. As an alternative, PCR amplification of
63 *stx* genes in enrichment cultures, followed by careful colony examination is the method of
64 choice by the majority of laboratories, but direct detection of Stx toxins can also be done by
65 immunoassays, which have been developed to check for the presence of Stx toxins in human
66 stools, but can be of use to analyze food samples as well (Acheson, et al., 1996).

67 Animals carrying STEC strains can disseminate them in the farm environment, thus
68 becoming a reservoir for recontamination of other animals and also for direct transmission to

69 humans (Farrokh, et al., 2013). Several studies have investigated the presence of STEC in
70 faecal samples obtained from sheep, but no other environmental samples, as air or water
71 have been tested in sheep farms to our knowledge, whereas in dairy cattle the farm
72 environment has been demonstrated to maintain detectable levels of STEC (Berry and
73 Wells, 2010).

74 Ewe breeding is an important activity in Spain (20% of the EU breeding ewe flock),
75 with more than 75 % of the Spanish production of ewe milk concentrated in the interior
76 regions. The majority of the milk is transformed into raw milk cheeses, which have been
77 shown to carry STEC strains, even after a long ripening period (Caro and García-Armesto,
78 2007).

79 The aims of this work were to study the prevalence of STEC in bulk tank ewes' milk
80 and farm environments and to characterize the isolates obtained from these samples to gain
81 information on reservoirs and sources of contamination. An additional task was to examine
82 the usefulness of a commercial immunoassay for detection of Shiga toxins in ewes' milk.

83

84 **2. Materials and methods**

85 *2.1. Sample Collection*

86 In this study samples of bulk tank ewes' milk were collected from 388 farms located
87 along different collection routes in Castilla y León (Northwest Spain), during the period of
88 June 2009 to June 2010. The majority of the samples (215) were taken in spring, the rest of
89 the samples corresponding to winter (89), summer (52) and autumn (32), reflecting the
90 periods of milk production. Milk samples of 100 ml were aseptically taken in sterile
91 containers.

92 Additional environmental samples from air, water, feed and faeces were taken from
93 10 farms, which were previously demonstrated as positive for the presence of STEC. The

94 environmental samples were collected at two different times, May (spring season) and
95 September (summer season). Ten litre air samples were collected using a Microbial Air
96 Sampler (Biotest Hycon, Dreieich, Germany) fitted with a Tryptone Soy Agar (TSA; Oxoid,
97 Basingstoke, UK) strip. Water troughs and feed samples were taken in sterile containers.
98 Sampling of faeces in farm premises was done with boot swabs following the protocol
99 outlined in the EU for monitoring the reduction of *Salmonella* in laying hens (European
100 Commission, 2011). In brief, two pairs of boot swabs, moistened with a solution of 0.1 %
101 peptone and 0.9 % NaCl, were used to walk through the premises using a route that
102 produced a sample for all parts of the farm. Boot swabs were removed carefully and stored
103 in sterile zip-bags for transport to the laboratory.

104 Milk and farm environment samples were immediately transported to the laboratory
105 in an insulated cooler.

106

107 *2.2. Sample processing*

108 Fifty ml of milk were cultured in 450 ml of Tryptone Soy Broth (TSB; Oxoid) plus
109 0.6 % yeast extract (TSBYE; Oxoid) at 42 °C for 18 h. A sample of one ml was taken and
110 centrifuged at 13000 g for 3 min; the supernatant was discarded and the pellet was washed
111 twice with 1 ml of Phosphate buffered saline (PBS, Oxoid) and finally suspended in 300 µl
112 of double-distilled water with 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid,
113 España) and 2 % Chelex 100 Resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). DNA was
114 released by heating at 100 °C for 15 min and the DNA preparations were centrifuged at
115 13000 g for 3 min and the supernatants transferred to a clean tube and stored at -20 °C until
116 needed. A loopful of the enriched sample was streaked onto CT-SMAC (Oxoid) plates and
117 incubated at 37 °C for 24 h. Another loopful was streaked onto Enterohaemolysin agar plates
118 (Beutin, et al., 1989) and observed after 4 h and 24 h of incubation at 37 °C. A minimum of

119 ten pink (sorbitol fermenters) and colourless (non fermenters) colonies in CT-SMAC and
120 haemolytic colonies after 24 h but not after 4 h of incubation in Enterohaemolysin agar
121 were picked, checked for purity on TSA (Oxoid) and streaked onto CT-SMAC and
122 MacConkey Agar (Oxoid) to record lactose and sorbitol fermentation. Pure colonies were
123 preserved at -40 °C in TSB plus 40 % Glycerol for further characterization.

124 TSA strips from the air sampling were homogenized with 50 ml of TSBYE in a
125 BagMixer 400blender (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France). Water samples (250
126 ml) were filtered through sterile 0.45 µm filters which were then incubated in 50 ml
127 TSBYE. Twenty five g of feed material were blended with 225 ml of TSBYE. Boot swabs
128 were unpacked and placed in 225 ml of TSBYE. All cultures were processed as described
129 above for DNA preparation and colony isolation.

130

131 2.3. *Shiga toxin detection in enriched milk samples*

132 ProSpecT Shiga Toxin Microplate Assay (Remel, Lenexa, KS, USA) was used as a
133 rapid method for the detection of Shiga toxin in bulk tank milk samples. An aliquot of 0.3
134 ml of the enriched milk sample was processed as described by the manufacturer. The results
135 of the assay were read at 450 nm in a Multiskan FC microplate spectrophotometer (Thermo
136 Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) and considered positive when the optical density was
137 greater than 0.150. Previous experiments were carried out with raw and freshly pasteurized
138 ewes' milk spiked with 1, 10 and 10⁵ cfu/ml of the *E. coli* O157:H7 strain CECT 4076
139 (CECT, Spanish Culture Collection, Valencia, Spain) and cultured in TSBYE as already
140 described. The ProSpecT Shiga Toxin Microplate Assay offered different performance
141 depending upon the type of milk used for previous experiments. Thus, with spiked
142 pasteurized milk, a positive result was observed after enrichment for the three levels of

143 inoculum, 1, 10 and 10⁵ cfu/ml. On the other hand, with spiked raw milk, a level of
144 inoculum of 10⁵ cfu/ml was needed to detect Shiga toxin.

145

146 2.4. PCR assays

147 PCR detection of *stx1* and *stx2* genes was carried out on DNA preparations obtained
148 from enriched samples using primers and conditions shown in Table 1 (Paton and Paton,
149 1998a). Colonies picked from CT-SMAC and Enterohaemolysin agar plates were cultured in
150 TSB at 37 °C overnight and 1 ml was centrifuged at 13000 g for 3 min and the pellet was
151 used for DNA preparation as described above. All the isolates considered as STEC were
152 additionally tested for a number of PCR assays: subtypes of *stx* genes, intimin (*eae* gene)
153 and intimin variant γ 1 (*eae γ 1* gene) and enterohaemolysin (*hlyA* gene) (Gannon, et al., 1993;
154 Oswald, et al., 2000; Scheutz, et al., 2012; Wang, et al., 2002). Primers and amplicon sizes
155 are listed in Table 1. PCR products (5 μ l) were analyzed by 1.5 % agarose gel
156 electrophoresis and viewed after ethidium bromide staining under UV light.

157

158 2.5. Serological test

159 Latex agglutination assays Dryspot *E. coli* O157 latex test and Dryspot *E. coli*
160 seroscreen (Oxoid) were used to identify the O157 and O26, O91, O103, O111, O128 and
161 O145 serogroups respectively, according to manufacturer's instructions.

162 Additional serotype identification was carried out by PCR detection of target genes
163 for the antigens O26, O45, O91, O103, O104, O111, O121, O128, O145, O146, and H7
164 (Table 2). Flagellar (H) antigen typing was carried out for the isolates presenting any of the
165 somatic antigens studied. PCR amplification of a fragment of the *fliC* gene was done using
166 the primers FliC-F and FliC-R described by Machado et al. (2000) and the PCR products
167 were purified with a Invisorb DNA Clean Up kit (STRATEC Molecular GMBH, Berlin,

168 Germany). Both strands were sequenced in a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems,
169 Foster City, CA, US). Sequences were edited using the Lasergene software (DNASTAR,
170 Inc., Madison, WI) and compared against sequences registered in GenBank database using
171 the BLAST tool.

172

173 2.6. Statistical analysis

174 To evaluate the effect of the season in the prevalence of *stx*-positive milk samples, a chi-
175 square test was carried out with the SPSS software (SPSS Version 19.0; SPSS Inc, Chicago,
176 IL) with a value of $p \leq 0.05$ and a confidence level of 0.95.

177

178 3. Results

179 3.1. Shiga toxin detection in milk

180 All the samples of bulk tank milk yielded negative results for Shiga toxin detection.

181

182 3.2. PCR detection of *stx* genes in milk and environmental samples

183 A total of 176 out of 388 (45.36 %) bulk tank milk samples were positive for the
184 presence of one or both *stx* genes. Thirty-five of these positive samples presented the *stx1*
185 gene, 39 the *stx2* and 102 had both genes. Milk samples taken in winter and spring showed
186 higher prevalence of *stx* genes than summer and autumn samples. Regarding environmental
187 samples, air and feed samples were always negative for *stx* genes. Nine out of 20 (45 %)
188 water samples were positive for *stx2* (8 samples, 40 %) or both *stx1* and *stx2* (1 sample, 5 %)
189 genes, whereas five faeces samples (25 %) were positive for *stx2* gene (Table 3).

190

191 3.3. STEC isolation and characterization

192 From 388 samples of bulk tank milk, fifty STEC isolates were obtained and
193 corresponded to samples taken in 34 farms (8.76 %), whereas two isolates were from 20
194 water samples (10 %; one from the spring sampling and the other from the summer
195 sampling, obtained from different farms) and ten isolates (5 from spring season and 5 from
196 summer season) from 20 ovine faeces samples (50 %). One farm yielded positive isolation
197 in both water and faeces samples in the summer season and three farms were positive for
198 STEC isolation from faeces in both seasons.

199 The majority of isolates (75.8 %; 47 out of 62) carried the *stx1* gene, 45 of them the
200 subtype *stx1c* and two the subtype *stx1a*. All but one of them carried the *hlyA* gene and the
201 isolate of the subtype *stx1a* being positive for amplification of *eae* gene as well. Thirty
202 seven isolates were obtained from milk samples, 9 from ovine faeces and 1 from water. Four
203 milk isolates were found in samples which were negative for *stx* amplification, whereas 11
204 samples carried the *stx1* gene, 23 *stx1* and *stx2* and 9 *stx2*. Four isolates, three from milk and
205 one from water samples, were positive for *stx2* amplification and all of them showed the
206 same genetic profile (*stx2c*, *fliCh7*, *eae*, *eaey1*, *hlyA*) and were ascribed to serotype
207 O157:H7. The remaining 11 isolates (10 from milk and one from ovine faeces) carried both
208 *stx1/stx2* genes and two of them were serotyped as O146:H21. In total, only six isolates were
209 assigned to serotypes (four O157:H7 and two O146:H21). The results are summarized in
210 Table 4. A complete dataset for the 62 isolates is supplied as supplementary information
211 (Table S1).

212

213 **4. Discussion**

214 STEC is a diverse group of microorganisms which differ in phenotypic traits as well
215 as in pathogenicity to humans. Detection from foods can be difficult because isolation plates
216 are usually overcrowded due to growth of competing microbiota (Farrokh, et al., 2013).

217 Enzyme immunoassays are a practical way to overcome some of these problems, because
218 they are targeted to the common factor among all STEC, the Shiga toxin; event though they
219 are primarily developed for testing human stools, several authors have used them for
220 screening foods and bovine faeces with promising results (Acheson, et al., 1996; Willford, et
221 al., 2009). In our study, the performance of the assay kit was highly sensitive when it was
222 used with spiked samples of pasteurized milk, but raw milk showed less sensitivity,
223 indicating a probable interference of the original microbiota. All the samples of bulk tank
224 milk tested yielded negative results, which mean that the level of STEC was very low to be
225 detected by this procedure.

226 Analysis of enriched milk samples by PCR showed an overall prevalence of STEC of
227 45.36 %, a figure considerably higher than those previously reported for ewes' milk by other
228 authors in Europe (between ca. 10 and 20 %; Caro, et al., 2006; Muehlherr, et al., 2003; Rey,
229 et al., 2006; Zdragas, et al., 2009). The prevalence of positive samples was higher in spring
230 and winter, as it was observed previously in ewes' milk with other bacterial groups,
231 probably because of seasonal management practices (confinement in winter and spring and
232 grazing in summer and autumn; de Garnica, et al., 2013). Fecal carriage of STEC by
233 ruminants is well documented, thus the detection of *stx* gene among samples of faeces taken
234 in the premises was expected. Drinking water can also disseminate STEC within the flock,
235 probably due to direct or indirect contamination with faeces, but may serve as a reservoir of
236 this microorganism and a route for dissemination to animals (Berry and Wells, 2010;
237 LeJeune, et al., 2001). Feed, previous to exposure to animals, is not considered as a vehicle
238 for transmission of STEC, although some contamination may occur in the feed trough
239 (Berry and Wells, 2010). In our study, samples were collected before feeds being distributed
240 in the feed bunks, thus explaining the lack of detection of STEC. It also seems that air is not
241 a suitable vehicle for transmission of STEC in sheep farms.

242 Milk samples from 34 bulk tanks yielded positive results for isolation of STEC. A
243 total of 50 isolates were obtained, with 13 samples carrying more than one strain, which
244 could be differentiated phenotypically by their patterns of lactose and sorbitol fermentation.
245 The rate of isolation (8.76 % of bulk tank milk samples) was higher than the rate obtained in
246 similar studies, between 1 % and 4.76 % (Dontorou, et al., 2004; Muehlherr, et al., 2003;
247 Rey, et al., 2006). It is noteworthy that some isolates were obtained from samples
248 considered *stx*-negative by PCR. Common procedures for study the prevalence of STEC in
249 foods and other samples do not include direct PCR detection from enrichment cultures or,
250 when this step is performed, only positive results are taking into account (Muehlherr, et al.,
251 2003), but it has been shown with other bacteria that a negative PCR result could yield a
252 positive isolation from plates (Sails, et al., 2003). DNA template degradation, presence of
253 inhibitors or interference due to high levels of non-target microorganisms are among the
254 possible explanations to this occurrence.

255 The data obtained in this study show higher rates for prevalence and isolation of
256 STEC from ewes' milk and this fact could be related to the enrichment procedure employed,
257 with no antibiotic added to the culture broth and a temperature of 42 °C. Some of the studies
258 carried out on ewes' milk used enrichment broth supplemented with novobiocin at 37 °C,
259 which has been reported to inhibit some STEC strains (Vimont, et al., 2006).

260 Four isolates were confirmed as belonging to serotype O157:H7, which is the
261 responsible for most outbreaks and cases of haemorrhagic colitis and HUS. All of them
262 showed a similar genotype, carrying the *eaeyl* variant. One of the isolates was obtained
263 from a water sample taken from a farm where other strains were isolated, both from bulk
264 tank milk and from faeces, but those isolates carried the *stxI* gene and lacked the *eae* gene.
265 The presence of strains of STEC O157:H7 in sheep has been demonstrated (Blanco, et al.,
266 2003b; Rey, et al., 2003), but its isolation from ewes' milk is not always achieved. At the

267 same time, its isolation from livestock drinking water is of concern, as it has been confirmed
268 that drinking water contaminated with *E. coli* O157:H7 can disseminate this organism to
269 cattle (Berry and Wells, 2010; LeJeune, et al., 2001). The intimin type of *E. coli* O157:H7
270 isolates (γ 1) is common among ovine isolates and is also associated with pathogenic human
271 strains (Blanco, et al., 2003b; Oswald, et al., 2000; Rey, et al., 2003). Two other milk
272 isolates carried a non- γ 1 *eae* gene, the association of the presence of the *eae* gene and the
273 virulence of STEC strains has been pointed by numerous authors (Blanco, et al., 2003b;
274 Boerlin, et al., 1999; Oswald, et al., 2000; Werber, et al., 2003). However, even though the
275 majority of the isolates lacked the *eae* gene, this fact must not be considered as a proof of
276 safety; it is well known that *eae*-negative strains are associated with human disease, though
277 they cause less severe illness than proper EHEC strains (those Stx and *eae* positives; Kaper,
278 et al., 2004).

279 Two additional milk isolates belonged to serotype O146:H21, which is commonly
280 found in sheep, and carried both *stx1* and *stx2* genes, a feature described by other authors
281 (Beutin, et al., 2007; Blanco, et al., 2003b; Rey, et al., 2003). This serotype has also been
282 found in human STEC strains (Blanco, et al., 2003b).

283 In total, only six out of 62 isolates were assigned to any of the studied serotypes,
284 which included the most important serotypes implicated in human disease. It is remarkable
285 that the serotype O91 was absent among the isolates, taking into account that it is one of the
286 most prevalent serotypes found in sheep in Spain (Blanco, et al., 2003b; Rey, et al., 2003).

287 In conclusion, Spanish bulk tank ewes' milk can constitute a source of STEC
288 transmission to humans, but the overall prevalence of serotypes involved in human disease
289 is low. The environment of the dairy farm may represent an important reservoir of this
290 microorganism, particularly drinking water. Milking hygiene and preventive hygienic

291 measures at farm level should be considered to reduce the contamination of raw ewes' milk
292 intended for human consumption or manufacturing of raw milk cheeses.

293

294 **Acknowledgements**

295 This work was financed by project AGL2011-26118/ALI of the Spanish R&D
296 program and Junta de Castilla y León (Ayuda Grupo de Excelencia GR155). Verónica Otero
297 was supported by a grant from the FPU program of the Spanish Government.

298

299 **References**

300 Acheson, D. W. K., Lincicome, L. L., De Breucker, S. & Keusch, G. T. (1996). Detection of
301 Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and milk by commercial
302 enzyme immunoassay. *Journal of Food Protection*, 59, 344-349.

303 Berry, E. D. & Wells, J. E. (2010). *Escherichia coli* O157: H7: Recent Advances in
304 Research on Occurrence, Transmission, and Control in Cattle and the Production
305 Environment. *Advances in Food and Nutrition Research*, 60, 67-117.

306 Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K. & Albrecht, N. (2007).
307 Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*
308 from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes.
309 *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4769-4775.

310 Beutin, L., Montenegro, M. A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S. &
311 Stephan, R. (1989). Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with
312 enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical*
313 *Microbiology*, 27, 2559-2564.

314 Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I., Alonso,
315 M. P., Coira, A., Rodriguez, A., Rey, J., Alonso, J. M. & Usera, M. A. (2003a).

316 Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence
317 genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans.
318 *Experimental Biology and Medicine*, 228, 345-351.

319 Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J.,
320 Alonso, M. P., Dahbi, G., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I. & Blanco, J. (2003b).
321 Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing
322 *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*,
323 41, 1351-1356.

324 Boerlin, P., McEwen, S. A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J. B., Johnson, R. P. & Gyles, C. L.
325 (1999). Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*
326 and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 497-503.

327 Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A. & Fach, P. (2010). Micro-array for the
328 identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*(STEC) seropathotypes
329 associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans.
330 *International Journal of Food Microbiology*, 142, 318-329.

331 Caro, I. & García-Armesto, M. R. (2007). Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia*
332 *coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*,
333 116, 410-413.

334 Caro, I., Fernandez-Barata, V. M., Alonso-Llamazares, A. & Garcia-Armesto, M. R. (2006).
335 Detection, occurrence, and characterization of *Escherichia coli* O157: H7 from raw ewe's
336 milk in Spain. *Journal of Food Protection*, 69, 920-924.

337 de Garnica, M., Linage, B., Carriedo, J., De La Fuente, L., García-Jimeno, M., Santos, J. &
338 Gonzalo, C. (2013). Relationship among specific bacterial counts and total bacterial and
339 somatic cell counts and factors influencing their variation in ovine bulk tank milk.
340 *Journal of Dairy Science*, 96, 1021-1029.

341 Dontorou, A., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Apostolou, I., Economou, V., Kansouzidou,
342 A. & Levidiotou, S. (2004). Isolation of a rare *Escherichia coli* O157:H7 strain from farm
343 animals in Greece. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27,
344 201-207.

345 European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 517/2011 of 25 May 2011
346 implementing Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the
347 Council as regards a Union target for the reduction of the prevalence of certain
348 *Salmonella* serotypes in laying hens of *Gallus gallus* and amending Regulation (EC)
349 No 2160/2003 and Commission Regulation (EU) No 200/2010. *Official Journal of the*
350 *European Union*, L138, 45-51.

351 Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D.,
352 Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J.,
353 Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K. & Cerf, O. (2013). Review of
354 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy
355 production. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 190-212.

356 Gannon, V. P., Rashed, M., King, R. K. & Thomas, E. J. (1993). Detection and
357 characterization of the eae gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using
358 polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1268-1274.

359 Gannon, V. P., D'Souza, S., Graham, T., King, R. K., Rahn, K. & Read, S. (1997). Use of
360 the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in
361 identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical*
362 *Microbiology*, 35, 656-662.

363 Grad, Y. H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H. M., Cerqueira, G. C., Fitzgerald,
364 M., Godfrey, P., Haas, B. J., Murphy, C. I., Russ, C., Sykes, S., Walker, B. J., Wortman,
365 J. R., Young, S., Zeng, Q., Abouelleil, A., Bochicchio, J., Chauvin, S., Desmet, T., Gujja,

366 S., McCowan, C., Montmayeur, A., Steelman, S., Frimodt-Moller, J., Petersen, A. M.,
367 Struve, C., Krogfelt, K. A., Bingen, E., Weill, F. X., Lander, E. S., Nusbaum, C., Birren,
368 B. W., Hung, D. T. & Hanage, W. P. (2012). Genomic epidemiology of the *Escherichia*
369 *coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proceedings of the National Academy of*
370 *Sciences of the United States of America*, 109, 3065-3070.

371 Johnson, K. E., Thorpe, C. M. & Sears, C. L. (2006). Emerging Infections: The Emerging
372 Clinical Importance of Non- \square O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Clinical*
373 *Infectious Diseases*, 43, 1587-1595.

374 Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*
375 *Reviews Microbiology*, 2, 123-140.

376 Karmali, M. A., Gannon, V. & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia*
377 *coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140, 360-370.

378 LeJeune, J. T., Besser, T. E. & Hancock, D. D. (2001). Cattle Water Troughs as Reservoirs
379 of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3053-3057.

380 Lin, A., Sultan, O., Lau, H. K., Wong, E., Hartman, G. & Lauzon, C. R. (2011). O serogroup
381 specific real time PCR assays for the detection and identification of nine clinically
382 relevant non-O157 STECs. *Food Microbiology*, 28, 478-483.

383 Liu, Y., DebRoy, C. & Fratamico, P. (2007). Sequencing and analysis of the *Escherichia*
384 *coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR
385 assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences. *Molecular*
386 *and Cellular Probes*, 21, 295-302.

387 Machado, J., Grimont, F. & Grimont, P. A. D. (2000). Identification of *Escherichia coli*
388 flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Research in Microbiology*, 151,
389 535-546.

390 Meng, J., LeJeune, J. T., Zhao, T. and Doyle, M. P. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia*
391 *coli*. In: Doyle, M. P. and Buchanan, R. L. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and*
392 *Frontiers*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 287-309.

393 Monday, S. R., Beisaw, A. & Feng, P. C. H. (2007). Identification of Shiga toxigenic
394 *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Molecular and Cellular*
395 *Probes*, *21*, 308-311.

396 Muehlherr, J. E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J. E. & Stephan, R. (2003). Microbiological
397 quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science*,
398 *86*, 3849-3856.

399 Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology*
400 *Reviews*, *11*, 142-201.

401 Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O. & Caprioli, A. (2000).
402 Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic
403 *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*, *68*,
404 64-71.

405 Paton, A. W. & Paton, J. C. (1998a). Detection and characterization of shiga toxigenic
406 *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic
407 *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*, 598-602.

408 Paton, J. C. & Paton, A. W. (1998b). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing
409 *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*, 450-479.

410 Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. & Fach, P. (2004). Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-
411 toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:
412 H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and Cellular*
413 *Probes*, *18*, 185-192.

414 Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J. E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M.,
415 García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R. & Alonso, J. M. (2006). Prevalence, serotypes
416 and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and
417 caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food*
418 *Microbiology*, 107, 212-217.

419 Rey, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, J. M., Hermoso, M.,
420 Hermoso, J., Alonso, M. P., Usera, M. A., González, E. A., Bernárdez, M. I. & Blanco, J.
421 (2003). Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga-producing *Escherichia coli*
422 isolated from sheep in Spain. *Veterinary Microbiology*, 94, 47-56.

423 Sails, A. D., Fox, A. J., Bolton, F. J., Wareing, D. R. & Greenway, D. L. (2003). A real-time
424 PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture.
425 *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1383-1390.

426 Scheutz, F., Møller Nielsen, E., Frimodt-Møller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R.,
427 Nataro, J. & Caprioli, A. (2011). Characteristics of the enteroaggregative Shiga
428 toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 strain causing the outbreak of
429 haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveillance*, 16,
430 19889.

431 Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A.,
432 Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez,
433 M., Persson, S. & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter Evaluation of a Sequence-Based
434 Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *Journal of*
435 *Clinical Microbiology*, 50, 2951-2963.

436 Vimont, A., Vernozy-Rozand, C. & Delignette-Muller, M. -. (2006). Isolation of *E. coli*
437 O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used
438 enrichment protocols. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 102-108.

439 Wang, G., Clark, C. G. & Rodgers, F. G. (2002). Detection in *Escherichia coli* of the genes
440 encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and
441 components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of Clinical*
442 *Microbiology*, 40, 3613-3619.

443 Werber, D., Fruth, A., Buchholz, U., Prager, R., Kramer, M., Ammon, A. & Tschäpe, H.
444 (2003). Strong association between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and
445 virulence genes *stx 2* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroup
446 O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. *European Journal of Clinical*
447 *Microbiology and Infectious Diseases*, 22, 726-730.

448 Willford, J., Mills, K. & Goodridge, L. D. (2009). Evaluation of Three Commercially
449 Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Detection of Shiga Toxin.
450 *Journal of Food Protection*, 72, 741-747.

451 Zdragas, A., Samouris, G., Filioussis, G. & Petridou, E. (2009). Isolation of *Escherichia coli*
452 O157: H7 from raw ewes' and goats' milk in Greece. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 3,
453 36-38.

454

455

456 **Table 1**

457 Primer sequences and predicted amplicon lengths of genes involved in the virulence of
 458 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.

459

Target	Primer	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
<i>stx1</i>	Stx1F	ATAAATTGCCATTCGTTGACTAC	180	(Paton and Paton, 1998a)
	Stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<i>stx2</i>	Stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	1998a)
	Stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>Eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881	(Oswald, et al., 2000)
	SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG		
<i>EHEC</i>	HlyA-	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG	569	(Wang, et al., 2002)
<i>hlyA</i>	a			
	HlyA-	TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC		
	b			
<i>eaey1</i>	AE 19	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA	1087	(Gannon, et al., 1993)
	AE 20	TCAGCGTGGTTGGATCAACCT		
<i>stx1a</i>	stx1a-	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478	(Scheutz, et al., 2012)
	F1			
	stx1a-	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG		
	R2			
<i>stx1c</i>	stx1c-	CCTTTCCTGGTACAACACTGCGGTT	252	
	F1			
	stx1c-	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA		

R1

stx1d stx1d- CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC 203

F1

stx1d- CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA

R1

stx2a stx2a- GCGATACTGRGBACTGTGGCC 349

F2 347

stx2a- CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG

R3

stx2a- GGCCACCTTCACTGTGAATGTG

R2

stx2b stx2b- AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC 251

F1

stx2b- CAGCAAATCCTGAACCTGACG

R1

stx2c stx2c- GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA 177

F1

stx2c- CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA

R2

stx2d stx2d- AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG 179

F1 280

stx2d- TTYCCGGCCACTTTTACTGTG

R1

stx2d- GCCTGATGCACAGGTACTGGAC

R2

<i>stx2e</i>	stx2e-	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	411
	F1		
	stx2e-	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	
	R2		
<i>stx2f</i>	stx2f-	TGGGCGTCATTCACTGGTTG	424
	F1		
	stx2f-	TAATGGCCGCCCTGTCTCC	
	R1		
<i>stx2g</i>	stx2g-	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573
	F1		
	stx2g-	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	
	R1		

460

461

462

463

464 **Table 2**465 Primers used in PCR for detection of serotypes of *Escherichia coli*.

466

Antigen	Target gene	Primer	Sequence (5'-3')	Amplification size (bp)	Reference
H7	<i>fliCh</i> 7	FLICH 7-F FLICH 7-R	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625	(Ganno n, et al., 1997)
O26	<i>wzx</i>	5'O26 3'O26	ACTCTTGCTTCGCCTGTT CAGCGATACTTTGAACCTTAT	268	(Monda y, et al., 2007)
O45	<i>wzy</i>	5'O45 3'O45	TACGATTTACACAAGCTTCCA TGCAATCGCATAAGGAAATA	254	(Lin, et al., 2011)
O91	<i>wzy</i>	5'O91 3'O91	CGATTTTCTGGAATGCTTGATG CAATACATAGTTTGATTTGTGTTTAAA GTTTAAT	105	(Perelle, et al., 2004)
O103	<i>wzx</i>	5'O103 3'O103	TATCCTTCATAGCCTGTTGTT AATAGTAATAAGCCAGACACCTG	320	(Monda y, et al., 2007)
O104	<i>wzx</i>	5'O104 3'O104	TGTCGCGCAAAGAATTTCAAC AAAATCCTTTAAACTATACGCC	99	(Bugare l, et al., 2010)

O111	wzx	5'O111	GTTGCGAGGAATAATTCTTCA	829	(Monda
		.3			y, et al.,
		3'O111	CCATAGATATTGCATAAAGGC		2007)
		.2			
O121	wzx	5'O121	GTAGCGAAAGGTTAGACTGG	651	(Monda
		3'O121	ATGGGAAAGCTGATACTGC		y, et al.,
					2007)
O128	wzx	5'O128	TCGATCGTCTTGTTTCAGGTT	195	(Lin, et
		3'O128	GAATGCAATGGGCAATTAAC		al.,
					2011)
O145	wzx	5'O145	TTGAGCACTTATCACAAGAGATT	418	(Monda
		.6			y, et al.,
		3'O145	GATTGAATAGCTGAAGTCATACTAAC		2007)
		.B			
O146	wzy	5'O146	ATTCGGGTAACGACCCTGTGTTGA	378	(Liu, et
		3'O146	AGACTGCTAATGCAAGGAACATGG		al.,
					2007)
H	<i>fliC</i>	FliC-F	CAAGTCATTAATAC(A/C)AACAGCC	Variabl	(Macha
antige		FliC-R	GACAT(A/G)TT(A/G)GA(G/A/C)ACTTC(e	do, et
n			G/C)GT		al.,
					2000)

467

468

469 **Table 3**

470 Prevalence of *stx* genes in milk and environmental samples.

471

Sample	Season		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1/stx2</i>	Total
Milk		388	35 (9.02 %)	39 (10.05 %)	102 (26.29 %)	176 (45.36 %)
Water	Spring	10		3 (30 %)	1 (10 %)	4 (40 %)
	Summer	10		5 (50 %)		5 (50 %)
Faeces	Spring	10		2 (20 %)		2 (20 %)
	Summer	10		3 (30 %)		3 (30 %)
Total		428	35 (8.18 %)	52 (12.15 %)	103 (24.06%)	190 (44.39 %)

472

473 **Table 4**

474 Origin, *stx* genes and serotypes of STEC isolates.

475

Source	Isolates (%)	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx2c</i> (O157:H7)	<i>stx1c/stx2b</i>
Milk	50 (80.6)	2	35	3	10 (2 O146:H21)
Faeces	10 (16.13)		9		1
Water	2 (3.22)		1	1	
Total	62	2	45	4	11

476

477