

Investigación de *Escherichia Coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos

Rípodas Navarro A.¹, Fernández Moreira D.², Macho Martínez M.³

Sanidad mil. 2017; 73 (3): 147-152, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Introducción: El término *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) abarca un grupo de patógenos alimentarios emergentes, implicados en numerosos brotes a nivel mundial. Son responsables de infecciones y enfermedades gastrointestinales graves tales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y la colitis hemorrágica (CH). Muchos alimentos han sido vinculados a estos brotes, destacando las carnes y derivados cárnicos crudos o insuficientemente cocinados. **Objetivo:** Evaluar la prevalencia de STEC en carnes y derivados, de especies de abasto y cinegéticas, consumidas dentro de las Fuerzas Armadas (FAS). **Material y Métodos:** Se analizaron un total de 170 muestras recibidas en el Servicio de Bromatología y Seguridad Alimentaria, del Centro Militar de Veterinaria. Para determinar la presencia de STEC se empleó la técnica de PCR a tiempo real mediante el uso del kit comercial *Custom TaqMan ISO STEC Screening Assay* (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS®. **Resultados:** La prevalencia de STEC en el total de las muestras analizadas fue de un 19,41 %. La hallada entre los preparados cárnicos de especies de abasto fue de un 25,42 %, mientras que la de derivados de carne de caza, fue de un 27,4 %. Los resultados obtenidos del cribado de STEC mostraron significación estadística. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos concuerdan con la mayoría de estudios anteriormente publicados, recalcando la importancia que representa el control de este grupo de patógenos, pudiéndose ampliar el espectro de matrices a analizar, dada la potencial exposición de los consumidores de las FAS a estos agentes.

PALABRAS CLAVE: *Escherichia coli* STEC, PCR a tiempo real, carnes y derivados cárnicos, prevalencia, Fuerzas Armadas.

Researching *Escherichia Coli* as a Shiga (STEC) toxin producer in meat and meat products

SUMMARY: Introduction: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is made up of a group of emerging food pathogens, implicated in numerous outbreaks worldwide. They are responsible for infections and serious gastrointestinal diseases such as hemolytic uremic syndrome (HUS) and hemorrhagic colitis (HC). Many foods have been linked to these outbreaks, with emphasis on raw or undercooked meat and meat products. **Aim:** To evaluate the prevalence of STEC in meat and meat products from food-producing and game species, consumed within the Armed Forces (AF). **Material and Methods:** We analyzed a total of 170 samples received in the Service of Bromatology and Food Safety, of the Veterinary Military Center. To determine the presence of STEC, real-time PCR technique was performed using the “Custom TaqMan ISO STEC Screening Assay” kit (Thermo Scientific™), following the manufacturer’s instructions. Statistical analysis was carried out using the SPSS® program. **Results:** The prevalence of STEC in the total amount of samples analyzed was 19.41%. Prevalence of meat products from food-producing species was 25.42%, whereas the one from game meat was 27.4%. The results obtained from the STEC screening showed statistical significance. **Conclusions:** The results obtained agree with most of previously published studies, emphasizing the importance of surveillance. Expanding the spectrum of matrices to analyze could be an interest approach, given the potential exposure of AF consumers to these agents.

KEY WORDS: *Escherichia coli* STEC, real-time PCR, meat and meat products; prevalence, AF.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo de entre 1,1 – 1,5 x 2 – 6 µm perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Aparecen aislados o en parejas, no forman esporas y pueden ser móviles gracias a flagelos peritricos. Son aerobios y anaerobios facultativos por lo que disponen de metabolismo respiratorio y

fermentativo. Son oxidasa-negativo y forman ácidos y gas a partir de la mayor parte de los hidratos de carbono fermentables.

Son mesófilos típicos, ya que puede crecer a temperaturas comprendidas entre 7°C y 50°C, alcanzando su crecimiento óptimo a 37°C, con valores de pH próximos a la neutralidad y un valor mínimo de actividad de agua de 0,95.

Para realizar el serotipado de las diferentes cepas, se ha utilizado la estructura antigénica formada por el antígeno somático o antígeno O, el antígeno flagelar o antígeno H y el antígeno capsular o antígeno K.

El antígeno somático se caracteriza por ser un lipopolisacárido presente en la membrana exterior de la bacteria. Si utilizamos el sistema propuesto por Kauffman, se conocen del orden de 180 antígenos somáticos (O1 a O185)¹⁻³.

El flagelo de *E. coli* está formado por varias subunidades de una única proteína, denominada flagelina, que está codificada por el gen *fliC*. Se conocen 56 antígenos flagelares (H1 a H56)^{1,2,3}.

¹ Cap. Veterinario. Servicio Bromatología y Seguridad Alimentaria. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Madrid. España.

² Servicio Bromatología y Seguridad Alimentaria. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Madrid. España.

³ Cte. Veterinario. Delegación de Defensa de Madrid. Madrid. España.

Dirección para correspondencia: aripnav@et.mde.es

Recibido: 20 de octubre de 2016

Aceptado: 18 de mayo de 2017

doi: 10.4321/S1887-85712017000300002

El antígeno capsular radica en el polisacárido ácido capsular (CPS), clasificándose este en dos grupos, I y II⁴.

Hoy en día, en función de sus mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia, las distintas cepas de *E. coli* se clasifican en seis grupos: *E. coli* enteropatogénicos (EPEC), *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC), *E. coli* enteroinvasivos (EIEC), *E. coli* enteroagregativos (EAEC), *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enterohemorrágicos, verotoxigénicos o productores de toxinas Shiga (EHEC/VTEC/STEC).

El grupo de cepas EHEC/VTEC/STEC, son capaces de producir toxinas, codificadas por bacteriófagos^{4,5,6,7} muy similares a la producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. Se han descrito dos tipos: la toxina Shiga 1 (Stx1) o verotoxina 1 (VT1) y la toxina Shiga 2 (Stx2) o verotoxina 2 (VT2); la capacidad de detección de las toxinas Stx activas mediante el test de toxicidad en células Vero explica ambas denominaciones (Stx/VT). Stx 1 se divide a su vez en tres subtipos y Stx2 en siete subtipos⁸.

Las cepas STEC pueden presentar factores de virulencia adicionales. Cabe destacar la intimina, proteína de la membrana externa responsable de la adhesión de las bacterias al epitelio intestinal. Se encuentra codificada en el gen *eae* que forma parte de la isla de patogenicidad cromosómica denominada *Locus for Enterocyte Effacement* (LEE). El gen *eae* está presente en las cepas de algunos de los serotipos más virulentos: O157:H7, O26:H11, O103:H2⁹.

Tabla 1. Variables dependientes.

Variable	Categorías
Presencia de STEC	Presunto positivo
	Negativo
Gen O157	Presencia en la muestra
	Ausencia en la muestra
Gen Stx 1/2	Presencia en la muestra
	Ausencia en la muestra
Gen eae	Presencia en la muestra
	Ausencia en la muestra

Otro factor de virulencia importante es la enterohemolisina codificada por el gen *ehxA* y situado en el plásmido EHEC, la presencia del LEE y el plásmido EHEC son marcadores de las cepas clásicas enterohemorrágicas, de los principales serotipos implicados en el 80% de los casos de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) en Europa y Estados Unidos^{10,11,12,13}.

La capacidad de adquisición y pérdida de estos factores de virulencia¹⁴, supone la principal problemática, desde el punto de vista epidemiológico, de este grupo de microorganismos.

Las toxinas Shiga de *E. coli* pueden producir diferentes cuadros en los seres humanos, desde diarrea leve a colitis hemorrágica (CH), pudiendo progresar a síndrome urémico hemolítico (SUH), acompañado de anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal agudo grave. Este cuadro clínico es el responsable de que a este grupo se le denomine frecuentemente *E. coli* enterohemorrágico (EHEC)¹⁵.

La mayoría de brotes y casos de SUH se han relacionado con el serotipo *E. coli* O157:H7; por ello, podemos encontrar a estos

patógenos clasificados en dos categorías: STEC O157 y STEC no-O157^{16,17}.

STEC O157

El primer aislamiento de *E. coli* O157:H7 se llevó a cabo en 1975 a partir de una muestra de heces de un paciente con diarrea sanguinolenta siendo registrado el primer brote en 1982 por el consumo de hamburguesas^{17,18}.

A pesar de que las cepas STEC no-O157 provocan más casos esporádicos y brotes que STEC O157, es más difícil realizar el estudio epidemiológico y encontrar los alimentos implicados debido a que *E. coli* O157:H7 es más patógena que la mayoría de las cepas no-O157. Ello conlleva que los brotes de *E. coli* O157:H7 sean reconocidos e investigados más rápidamente¹⁷.

Hoy en día hay muchos alimentos implicados en la transmisión de STEC O157, aunque inicialmente se relacionó con la carne de vacuno. Griffin y Tauxe¹⁹ establecieron que aproximadamente el 52% de los brotes alimentarios producidos por *E. coli* O157:H7 se relacionan con productos de origen bovino. Los productos implicados con mayor frecuencia son hamburguesas y carne picada poco cocinada²⁰.

Tabla 2. Combinaciones de genes obtenidas entre las muestras presuntas positivas.

Vector/alimento implicado	Preparados Cárnicos	Derivados de carne de caza
O157 + <i>eae</i>	8	1
<i>Stx 1/2</i> + <i>eae</i>	2	14
O157 + <i>eae</i> + <i>Stx 1/2</i>	4	0
<i>Stx 1/2</i>	1	2

La leche es una fuente común de infección de *E. coli* O157:H7, debido fundamentalmente a la contaminación fecal²¹. El microorganismo se ha aislado de leche cruda, leche pasteurizada y queso^{22,23,24}.

La prevalencia de *E. coli* O157:H7 en carne de ovino es muy baja, en torno a un 2%²⁵, aunque Chapman²⁶ concluyó que su aislamiento era mayor en productos cárnicos de ovino que en productos cárnicos de vacuno.

Respecto a las especies cinegéticas, además de haber actuado como vectores en brotes de origen alimentario dispersando *E. coli* O157:H7 en zonas de cultivos²⁷, la bacteria se ha aislado de cecina y solomillo de ciervo^{28,29}.

Se han descrito brotes de *E. coli* O157:H7 por consumo de espinacas, mezcla de lechugas de cuarta gama, zumo de manzana sin pasteurizar y brotes de rábano^{27,30,31,32}.

STEC NO-O157

Desde que se produjera el primer brote en Japón en 1984 por una cepa de *E. coli* O145:H-³³, los serogrupos no-O157 más relacionados con casos de enfermedad en humanos son el O23, O45, O103, O111, O121 y O145. Estos serogrupos se han denominado

Investigación de Escherichia Coli productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos

como el *big six* por el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)³⁴.

Se han aislado diferentes cepas de STEC no-O157 en carne y derivados cárnicos de todas las especies domésticas de, leche de vaca y oveja, queso de oveja, carne de caza (ciervo (*Cervus elaphus* Linnaeus, 1758), jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758), muflón (*Ovis orientalis moussimon* Pallas, 1762) y carne picada de ternera^{24,35,36,37,38}.

Tabla 3. Variables independientes.

Variable	Categorías
Tipo de muestra	Preparado cárnico
	Producto cárnico
	Plato preparado
	Derivado de carne de caza
Origen del derivado cárnico	Especies domésticas de abasto
	Carne de caza
Especie cinegética	Preparado cárnico de ciervo
	Preparado cárnico de jabalí

El brote producido por el serotipo O104:H4 en el año 2011 tuvo un gran impacto mediático en Europa. A pesar de la controversia generada en cuanto al origen del brote y, aunque no se pudo aislar la cepa causante en ninguna muestra de alimentos, se atribuyó el origen a unos brotes para ensalada³⁹.

Se ha descrito también la transmisión de STEC no-O157 a través de bebidas tales como sidra de manzana, zumo de frutas y la variedad de lechuga iceberg^{34,40,41,42,43}.

El uso de derivados cárnicos de especies domésticas de abasto es habitual dentro de las Fuerzas Armadas (FAS) así como, y aunque en menor medida, el consumo de carne de especies cinegéticas. Por ello y porque la notificación de casos por STEC sigue aumentando año tras año^{44,45}, el objetivo de este estudio es evaluar la prevalencia de STEC dentro de las FAS.

Tabla 4. Test Exacto de Fisher para evaluar asociación entre el tipo de muestra y la presencia de STEC.

Tipo de muestra	Negativo	Presunto Positivo	p valor
Preparado Cárnico	44 (74,57%)	15 (25,42%)	< 0,001
Producto Cárnico	40 (100%)	0 (0%)	
Plato Preparado	9 (100%)	0 (0%)	
Derivado de carne de caza	44 (70,97%)	18 (29,03%)	

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras analizadas en este estudio fueron las siguientes:

- 108 muestras recibidas en el Servicio de Bromatología y Seguridad Alimentaria del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa (CEMILVETDEF), clasificadas de acuerdo a la reglamentación técnica vigente como⁴⁶:

- o 59 preparados cárnicos.
- o 40 productos cárnicos.
- o 9 platos preparados.
- 62 muestras de derivados de carne de caza congelados, clasificadas como:
 - o 31 preparados cárnicos de ciervo.
 - o 31 preparados cárnicos de jabalí.

El procedimiento de pre-enriquecimiento fue el mismo para todas las muestras; se tomaron 25 g. y se diluyeron en 225 g. de agua de peptona tamponada, incubándose a 37°C durante 24 h.

Para la extracción del ADN se utilizó el kit *PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la investigación de STEC mediante Real Time PCR, se utilizó el kit *Custom TaqMan ISO STEC Screening Assay* (Thermo Scientific™), según las instrucciones del fabricante.

Las condiciones de amplificación del ensayo mediante PCR fueron:

- Desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C.
- 40 ciclos de 3 segundos de desnaturalización a 95°C y 30 segundos de hibridación y extensión a 60°C.

El criterio para clasificar una muestra a partir de la interpretación de la curva de amplificación es el siguiente:

- Presunto positivo: La amplificación del gen O157 y/o Stx1/2 debe darse antes del ciclo 40.
- Negativo: No se produce amplificación de ningún gen o, únicamente se amplifica el gen *aeae* antes del ciclo 40.

Para realizar el análisis estadístico se han utilizado las siguientes variables:

Como variables dependientes se han utilizado las variables cualitativas que se recogen en la Tabla 1 con sus diferentes categorías.

Como variables independientes se han utilizado las variables cualitativas recogidas en la Tabla 3, con sus diferentes categorías.

Se ha tratado de determinar la asociación o independencia de la distribución de las variables dependientes entre las independientes. Para ello se ha utilizado el test X² de Pearson, y en aquellos casos en los que no ha sido posible, se ha utilizado la Prueba Exacta de Fischer.

Tabla 5. Test Ji-cuadrado de Pearson para evaluar asociación entre el origen de los derivados cárnicos y la presencia de STEC.

Origen del derivado cárnico	Negativo	Presunto Positivo	p valor
Especies domésticas de abasto	84 (84,85%)	15 (15,15%)	0,034
Carne de caza	44 (70,97%)	18 (29,03%)	

Tabla 6. Test Ji-cuadrado de Pearson para evaluar asociación entre la especie cinegética y la presencia de STEC.

Especie cinegética	Negativo	Presunto Positivo	p valor
Preparado cárnico de ciervo	15 (48,39%)	16 (51,61%)	<0,001
Preparado cárnico de jabalí	29 (93,55%)	2 (6,45%)	

El error α asumido fue del 5% y se ha utilizado el software de análisis estadístico SPSS® v.19.

Tabla 7. Prevalencia de los diferentes genes codificadores de factores de virulencia según el origen de los derivados cárnicos (%).

Gen	Especies domésticas de abasto	Carne de caza	ρ valor
<i>eae</i>	22,22	61,29	< 0,001
<i>Stx 1/2</i>	7,07	27,42	< 0,001
<i>O157</i>	12,12	1,61	0,017

RESULTADOS

Análisis descriptivo de los resultados obtenidos

La prevalencia de presuntos positivos STEC en las 170 muestras analizadas es de un 19,41 %.

No se han encontrado presuntos positivos entre los productos cárnicos ni entre los platos preparados. La prevalencia de presuntos positivos STEC entre los preparados cárnicos es 25,42 % (15 muestras) (Figura 1).

La prevalencia de STEC en derivados de carne de caza es de 27,4 %. En el caso de los preparados cárnicos de jabalí es del 6,8 % (2 muestras) y en el caso de los preparados cárnicos de ciervo es del 51,61 % (Figura 2).

En la Tabla 2 se resumen las combinaciones de genes que hemos encontrado entre las muestras presuntas positivas.

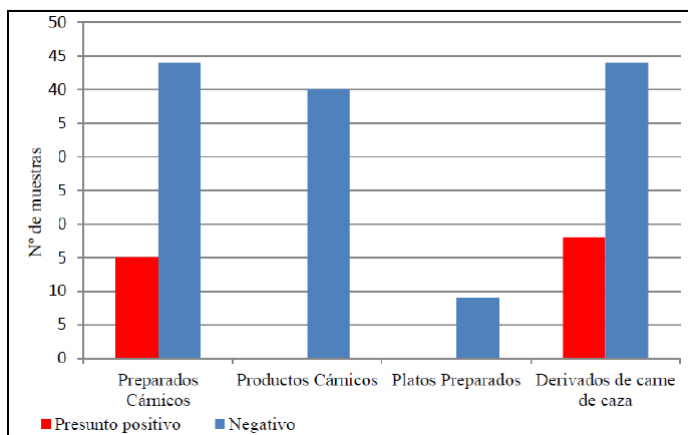


Figura 1. Resultados del cribado de STEC en las muestras analizadas.

Resultados del análisis estadístico

El resultado obtenido tras realizar el Test Exacto de Fischer para evaluar la asociación entre el tipo de muestra y el resultado del cribado se recoge en la Tabla 4.

El resultado del cribado de STEC presenta una distribución diferente y estadísticamente significativa en función del tipo de muestra.

El resultado obtenido tras realizar el test X^2 de Pearson para evaluar la asociación entre el tipo de derivado cárnico y el resultado del cribado, se recoge en la Tabla 5.

La prevalencia de STEC en los derivados cárnicos correspondientes a especies domésticas de abasto analizados en este estudio, es menor que la hallada en derivados cárnicos de especies cinegéticas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

El resultado obtenido tras realizar el test X^2 de Pearson para evaluar la asociación entre la especie cinegética y el resultado del cribado, se recoge la Tabla 6.

La prevalencia de STEC es diferente en función de la especie cinegética que se trate y, esa diferencia, es estadísticamente significativa.

La prevalencia de los diferentes factores de virulencia dependiendo del origen del derivado cárnico y su significación estadística, se resumen en la Tabla 7.

La prevalencia de los genes *eae* y *Stx 1/2* es menor en los derivados cárnicos de especies domésticas de abasto. En cambio, la prevalencia del gen *O157* es mayor en estos derivados.

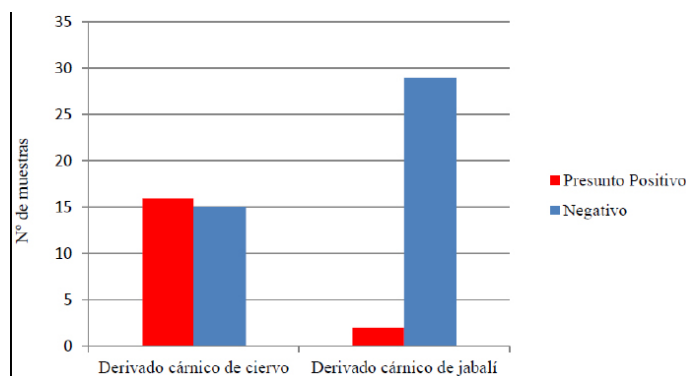


Figura 2. Resultados del cribado de STEC en derivados de carne de caza.

DISCUSIÓN

La prevalencia de nuestros resultados en relación a la presencia de STEC en derivados cárnicos coincide con la obtenida por Auvray *et al.*⁴⁷ y Samadpour *et al.*⁴⁸, alrededor de un 16%. Adwan y Adwan encontraron una prevalencia similar en 300 muestras de carne de vacuno cruda⁴⁹.

Entre los estudios que han obtenido una prevalencia menor podemos citar el de Pradel *et al.*⁵⁰ con un 11% de positivos entre 411 muestras de carne y derivados cárnicos de vacuno. En el trabajo de Blanco *et al.*⁵¹ se obtuvo una prevalencia del 12% en diversos productos entre los que se encuentra la carne de vacuno mientras que Perelle *et al.*⁵² detectaron un 15% de STEC entre 300 muestras de carne de vacuno.

En este sentido, cabe destacar los datos publicados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el año 2014. De las 2522 muestras de carne y derivados cárnicos de vacuno analizadas por 13 estados miembros y Suiza, únicamente el 3% fueron positivas⁴⁵.

La prevalencia obtenida por Acheson *et al.*⁵³ supera nuestros resultados en diez puntos. Esto podría explicarse debido a que Acheson *et al.* utilizaron diferentes caldos de cultivo para realizar el preenriquecimiento de las muestras y el método de cribado incluía un enzimo-inmunoensayo.

El papel de las especies cinegéticas en la transmisión de STEC, ya sea como reservorio o como fuente de infección, es

Investigación de Escherichia Coli productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos

cada vez más importante y los resultados obtenidos están en consonancia con esta afirmación^{27,28,29,54,55}.

La prevalencia de STEC obtenida en este estudio concuerda con la notificada a la EFSA por Italia y Austria⁴⁵. Sin embargo, si tenemos en cuenta únicamente a los rumiantes salvajes, nuestros resultados duplican lo notificado por estos países. Nuestra prevalencia es tres veces superior a la obtenida en los estudios de Piérard *et al.*⁵⁶ y Miko *et al.*³⁷, realizados en Bélgica y Alemania respectivamente.

No hemos encontrado ningún estudio que investigase la presencia de STEC en la carne de caza, cuya prevalencia superase a la de nuestro trabajo. Esto se debe a que la mayoría de estudios sobre prevalencia de STEC en especies cinegéticas se basan en el estudio de muestras de heces; la prevalencia de este microorganismo es mayor en el tracto intestinal y debe producirse contaminación cruzada durante el faenado de la canal para que esta se contamine. Esto podría explicar que sólo hayamos encontrado prevalencias superiores a la nuestra en este tipo de trabajos^{28,57}.

Además, un factor limitante en la comparabilidad de nuestro estudio frente a otros proviene de las características del diseño de nuestra técnica diagnóstica; por un lado detectamos la presencia del gen *Stx* independientemente del tipo (1 ó 2), y por otro, incluimos el gen *O157* como factor de virulencia junto con el resto (*stx*, *eae*). Si bien es cierto que en el caso de los estudios de prevalencia en cuanto a la presencia conjunta del gen *O157* y el gen *eae*, nuestros resultados concuerdan con lo publicado por Mora *et al.*⁵⁸.

BIBLIOGRAFÍA

1. EFSA BIOHAZ Panel, EFSA FIP & EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. *EFSA J.* 9, 35 (2011).
2. EFSA. Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *EFSA J.* 9, 50 (2011).
3. EFSA. Statement summarising the Conclusions and Recommendations from the Opinions on the safety of Irradiation of Food adopted by the BIOHAZ and CEF Panels. *EFSA J.* 9, 155 (2011).
4. Garrity, G. *et al.* *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria.* (Springer Science & Business Media, 2006).
5. Konowalchuk, J., Speirs, J. I. & Stavric, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18, 775–779 (1977).
6. Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155, 377–389 (1987).
7. Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A. & Fach, P. 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 (2010).
8. Feng, P. C., Jinneman, K., Scheutz, F. & Monday, S. R. Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6699–6702 (2011).
9. Louie, M. *et al.* Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol. Infect.* 112, 449–461 (1994).
10. Garrido, P. *et al.* STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clin. Chem.* 52, 192–201 (2006).
11. Garmendia, J., Frankel, G. & Crepin, V. F. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infect. Immun.* 73, 2573–2585 (2005).
12. EFSA Working Group. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic types. *EFSA J.* 579, 1–61 (2007).
13. Mora, A. *et al.* HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. *Int. Microbiol.* (2009). doi:10.2436/20.1501.01.104
14. Wu, G. *et al.* Genetic diversity among *Escherichia coli* O157: H7 isolates and identification of genes linked to human infections. *Infect. Immun.* 76, 845–856 (2008).
15. Noris, M. & Remuzzi, G. Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 361, 1676–1687 (2009).
16. Gyles, C. L. Shiga toxin-producing An overview. *J. Anim. Sci.* 85, E45–E62 (2007).
17. Kaspar, C., Doyle, M. E. & Archer, J. Food Safety Review: non-O157: H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. *Food Res. Inst. UW-Madison Dispon. En Httpfri Wisc EduocspdfFRIBriefNonO157S-TEC410 Pdf Acceso 17-10-12* (2009).
18. Riley, L. W. *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681–685 (1983).
19. Griffin, P. M. & Tauxe, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13, 60–98 (1991).
20. Alexandre, M., Prado, V., Ulloa, M. T., Arellano, C. & Rios, M. Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Meat Foods using DNA Probes, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. Ser. B* 48, 321–330 (2001).
21. Armstrong, G. L., Hollingsworth, J. & Morris Jr, J. G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157: H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.* 18, 29–51 (1996).
22. Keene, W. E. *et al.* A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *J. Infect. Dis.* 176, 815–818 (1997).
23. Upton, P. & Coia, J. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *The Lancet* 344, 1015 (1994).
24. Mora, A. *et al.* 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 (2007).
25. Doyle, M. P. & Schoeni, J. L. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2394–2396 (1987).
26. Chapman, P. A. Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the past 15 years in Sheffield, UK. *J. Appl. Microbiol.* 88, (2000).
27. Jay, M. T. *et al.* *Escherichia coli* O157: H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg Infect Dis* 13, 1908–1911 (2007).
28. Sánchez, S. *et al.* Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157: H7 in wild ruminants. *Vet. J.* 180, 384–388 (2009).
29. Rabatsky-Ehr, T. *et al.* Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157: H7 infection. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 525 (2002).
30. Hilborn, E. D. *et al.* A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch. Intern. Med.* 159, 1758–1764 (1999).
31. Cody, S. H. *et al.* An outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann. Intern. Med.* 130, 202–209 (1999).
32. Michino, H. *et al.* Massive outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 150, 787–796 (1999).
33. Kannali, M. A., Petric, M., Liin, C. & others. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 151, 775–782 (1985).
34. Brooks, J. T. *et al.* Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J. Infect. Dis.* 192, 1422–1429 (2005).
35. Martin, A. & Beutin, L. 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 (2011).

36. Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. & Fach, P. 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 (2004).
37. Miko, A. *et al.* Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6462–6470 (2009).
38. Mora, A. *et al.* 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 (2011).
39. European Food Safety Association. *Tracing seeds, in particular fenugreek (Trigonella foenum-graecum) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing E. coli (STEC) O104: H4 2011 outbreaks in Germany and France.* (Technical report of EFSA. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/176e.pdf>. Accessed 20 February, 2013).
40. Bopp, C. *Non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli: isolation and detection challenges.* Centers for Disease Control and Prevention. (2009).
41. Jajosky, R. A. *et al.* Summary of notifiable diseases—United States, 2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 53, 1–79 (2006).
42. Mathusa, E. C., Chen, Y., Enache, E. & Hontz, L. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Foods. *J. Food Prot.* 73, 1721–1736 (2010).
43. Bergmire-Sweat, D. *et al.* *Escherichia coli* O111: H8 outbreak among teenage campers-Texas, 1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 49, 321–324 (2000).
44. EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* 17, (2012).
45. EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13, 191 (2015).
46. Ministerio de la Presidencia. *Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos.* RD 474, 21 (2014).
47. Auvray, F. *et al.* Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 646–651 (2007).
48. Samadpour, M. *et al.* Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef and Cattle Feces from King County, Washington. *J. Food Prot.* 65, 1322–1325 (2002).
49. Adwan, G. M. & Adwan, K. M. Isolation of shiga toxigenic *Escherichia coli* from raw beef in Palestine. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 81–84 (2004).
50. Pradel, N. *et al.* Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1023–1031 (2000).
51. Blanco, J. *et al.* Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157: H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp. Biol. Med.* 228, 345–351 (2003).
52. Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. & Fach, P. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 284–288 (2007).
53. Acheson, D. W. K., Lincicome, L. L., De Breucker, S. & Keusch, G. T. Detection of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef and Milk by Commercial Enzyme Immunoassay. *J. Food Prot.* 59, 344–349 (1996).
54. Nagano, H. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of β -D-glucuronidase-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 isolates from deer. *J. Med. Microbiol.* 53, 1037–1043 (2004).
55. García-Sánchez, A. *et al.* Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. *Vet. Microbiol.* 121, 373–377 (2007).
56. Pierard, D., Van Damme, L., Moriau, L., Stevens, D. & Lauwers, S. Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4585–4587 (1997).
57. Lehmann, S., Timm, M., Steinrück, H. & Gallien, P. Detection of STEC in faecal samples of free-ranging wild and in wild meat samples. *Fleischwirtschaft* 4, 93–96 (2006).
58. Mora, A. *et al.* 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 (2005).