







Detección de *Escherichia coli* productora de toxina-Shiga en bovinos asintomáticos del sur de Sonora, México

Detection of Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* in asymptomatic cattle in the southern Sonora, Mexico

Cristhoper Michel Rivas-Ruiz¹ ,
Ernesto Uriel Cantú-Soto^{1*} ,
Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza³ ,
Alejandro Miguel Figueroa-López¹ ,
Julio Armando Anduro-Jordan¹ ,
Pablo Luna-Nevarez² ,
Pedro Alan López-Castro²

¹Departamento de Biotecnología y Ciencia Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de febrero 818 sur Col. Centro, CP. 85000. Tel. (644) 4109000, ext. 2133. Cd. Obregón, Sonora, México.

²Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Instituto Tecnológico de Sonora. Av. Antonio Caso s/n Col. Villa ITSON, CP. 85130. Cd. Obregón, Sonora, México.

³Centro de Desarrollo Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR)-Unidad Sinaloa. Departamento de Biotecnología Agrícola. Instituto Politécnico Nacional. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. CP. 81101. AP280. Guasave, Sinaloa, México.

*Autor de correspondencia:
ernesto.cantu@itson.edu.mx

Nota científica

Recibida: 14 de abril de 2019

Aceptada: 06 de junio de 2020

Como citar: Rivas-Ruiz CM, Cantú-Soto EU, Maldonado-Mendoza IE, Figueroa-López AM, Anduro-Jordan JA, Luna-Nevarez P, López-Castro PA (2020) Detección de *Escherichia coli* productora de toxina-Shiga en bovinos asintomáticos del sur de Sonora, México. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 7(2): e2240. DOI: 10.19136/era.a7n2.2240

RESUMEN. La crianza de ganado bovino es vital para la producción de carne, que en México es una actividad esencial. El bovino es portador asintomático de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), y son considerados el principal reservorio y súper propagadores del serotipo O157:H7. Este representa el primer reporte sobre STEC O157:H7 detectada en heces de bovinos asintomáticos, criados para abasto de carne en el noroeste de México. El objetivo fue identificar el serotipo STEC O157:H7 en bovinos asintomáticos criados en el sur de Sonora, México empleando PCR multiplex para con ello avanzar en el entendimiento de su capacidad propagadora. La incidencia de la STEC O157:H7 fue del 3.1% y de STEC no O157 de 19.8%. Estos resultados sugieren que el ganado bovino es un reservorio primario de STEC en esta región del país; sin embargo, es necesario profundizar para establecer si el patógeno contamina otras matrices como agua o alimentos.

Palabras clave: Bovinos asintomáticos, México, O157:H7, STEC, súper propagadores.

ABSTRACT. The breeding and fattening of cattle are necessary for the production of meat; in Mexico it is an essential activity. Cattle is an asymptomatic carrier of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), and they are considered the main reservoir and super-shedder of serotype O157:H7. The aim of this work was to identify the STEC O157:H7 serotype in asymptomatic cattle raised in southern Sonora, Mexico, using multiplex PCR in order to understand of its propagation capacity. The incidence of serotype O157:H7 was 3.1% and STEC non-O157 was 19.8%. These results suggest cattle as a primary reservoir of STEC in this region of the country; nonetheless, studies are still needed to establish whether excreted strains contaminate the food, environment and/or water streams.

Key words: Asymptomatic bovines, Mexico, O157:H7, STEC, super-shedder.

INTRODUCCIÓN

El ganado bovino es un reservorio natural de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Heredia and García 2018). *E. coli* STEC pertenece a un grupo zoonótico emergente de patógenos al humano, caracterizado por poseer dentro de su genoma los genes *stx1* y *stx2*, responsables de codificar dos potentes verocitotoxinas llamadas toxina Shiga 1 (*Stx1*) y toxina Shiga 2 (*Stx2*), las cuales son reconocidas como su principal factor de patogenicidad (Schuller 2011, Terajima et al. 2017). Además, algunas STEC poseen factores de virulencia adicionales, como proteínas de adhesión a células epiteliales (*eaeA*) y/o toxinas de tipo hemolíticas (*ehxA*) (Soledad-Cadona et al. 2018).

La dosis infectiva de las STEC es de 5 a 100 células para el humano, pudiendo causar diarrea, colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH), y en casos severos la muerte (Amézquita-López et al. 2018, Joseph et al. 2020, Nguyen et al. 2016). El ganado es portador asintomático de un gran número de serotipos STEC, encontrándose principalmente en su tracto gastrointestinal y recto cuando estos tienen pocas horas de nacido, y hasta los primeros meses de vida (Callaway et al. 2013). Algunas STEC causan al bovino enfermedades gastrointestinales, por ejemplo, la STEC O26 (Blanchard 2012). Otros serotipos patógenos al humano como las STEC O157 y STEC O104 no provocan síntomas en el ganado (Shridhar et al. 2017, Swaggerty et al. 2018). El ganado bovino es capaz de excretar hasta 10^4 UFC (Unidades formadoras de colonia) de STEC por gramo de heces, las cuales son capaces de permanecer viables hasta por 90 días (Chase-Topping et al. 2008, Mir et al. 2020).

En México la crianza y engorda de ganado bovino con fines de exportación representa una actividad con gran demanda y rentabilidad. En el 2017 se registró una producción de 842 372 cabezas de ganado; reportando este mismo año el estado de Sonora una producción de 321 133 cabezas de ganado bovino, lo que lo posicionó como el estado con mayor producción del país (SIAP 2018). Por lo que el alto número de producción de cabezas de

ganado bovino en el estado podría significar un riesgo de infección zoonótica para los habitantes.

En México el estudio de propagadores STEC como lo es el reservorio bovino, ha sido escasamente abordado en la última década (Amézquita-López et al. 2012, Navarro et al. 2018). El objetivo de este estudio fue identificar el serotipo STEC O157:H7 en bovinos asintomáticos criados en el sur de Sonora, México empleando PCR multiplex para con ello avanzar en el entendimiento de su capacidad propagadora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el año 2018 se realizó un muestreo a conveniencia de 60 bovinos, en dos hatos ganaderos dedicados a la crianza de ganado para la producción de carne de exportación y nacional, de los cuales el 50% se encontraban registrados en el Sistema Nacional de Identificación Individual de Ganado (SINIIGA), en el municipio de Cajeme, Sonora. Las razas muestreadas fueron Charolais, Simental Charbray, Simbrah y sus cruza; la edad osciló entre 6 y 24 meses. De cada animal se colectaron de manera aséptica aproximadamente 100 g de heces fecales del recto, para luego conservarse en doble empaquetado en recipientes estériles con cierre hermético en refrigeración a 4 °C, hasta su análisis en el laboratorio (OIE 2018). El aislamiento y caracterización bioquímica de cepas sospechosas STEC se realizó de acuerdo con el Bacteriological Analytical Manual-FDA (Feng et al. 2017), con modificaciones, consistente en enriquecimiento de 25 g de muestra en 225 mL de buffer de fosfatos butterfield que se incubaron a 37 ± 1 °C por 24 h, seguido de diluciones seriadas (hasta 10^{-4}). Posteriormente se sembraron 50 μ L de las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} en placas de agar Rainbow[®] O157 (Biolog, cat. 80102) mediante estría por agotamiento. Las colonias típicas STEC a partir del agar Rainbow[®] O157 (azules y/o negras) se inocularon en caldo tripticasa de soya (Oxoid LTD, cat. CM0129), posteriormente las cepas fueron criopreservadas en glicerol 20% a -70 °C en el Laboratorio de Investigación en Microbiología Molecular del Instituto Tecnológico de Sonora.

La morfología de los aislados se determinó por medio de tinción de Gram, y la prueba del indol en papel filtro no. 1 (WhatmanTM, cat. 1001125) impregnado con 0.9 mL de reactivo de Kovac (Sigma-Aldrich, cat. 1092930100). La capacidad de producción de la enzima β -D-glucuronidasa (GUD) se determinó tomando 1 mL de caldo *Escherichia coli*-MUG (Oxoid LTD, cat.1791486), que se inoculó con 10 μ L del cultivo que se incubaron por 24 h a 37 ± 1 °C; para luego observar por fluorescencia (azul) bajo luz UV. La extracción de ADN genómico se realizó con el DNeasy[®] Blood and Tissue kit (Qiagen[®], cat.69504) protocolo para bacterias Gram-negativas. La concentración y pureza del ADN se evaluó con espectrofotómetro Nanodrop 2000c (ThermoFisher Scientific) y la integridad se verificó por electroforesis. Para el análisis por PCR se utilizó como control positivo ADN genómico de *E. coli* O157:H7 (cepa CIBNOR-México) y como control negativo ADN de la *E. coli* ATCC 25922.

La PCR multiplex (mPCR) se estandarizó de acuerdo con lo indicado por Feng *et al.* (2017) con modificaciones. Se utilizaron oligonucleótidos para amplificar los genes *stx1* y *stx2*; otro par de oligonucleótidos para amplificar un fragmento del gen γ -*eaeA*; un par para amplificar una región específica del gen *uidA*; y un par para amplificar un fragmento del gen *ehxA* (Tabla 1). Los genes *stx1* y *stx2* participan en la producción de toxina Shiga 1 y 2. El gen γ -*eaeA* amplifica un fragmento del gen de la proteína intimina de la membrana plasmática externa. Los oligonucleótidos +93 *uidA* amplifican una región específica del gen de la enzima β -glucuronidasa (*uidA*) que contiene el polimorfismo de nucleótido simple +93. Los oligonucleótidos *ehxA* amplifican un fragmento del gen de la toxina hemolisina.

Adicionalmente, para las cepas que presentaron el perfil molecular del serotipo O157:H7 (Feng *et al.* 2017), se determinó la presencia de los antígenos O157 (gen *rfB*) y H7 (gen *fliCH7*) para confirmar su identidad como O157:H7 (Ateba and Mbewe 2011, Thapa *et al.* 2012).

La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 μ L, las concentraciones utilizadas fueron 0.32 μ M de cada iniciador (Tabla 1), buffer 1X (-MgCl₂),

3 mM de MgCl₂, 0.6 mM de dNTPs (Invitrogen, cat.10297018), 1.25 U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, cat.11615010), 1 μ L de ADN (15 - 20 ng μ L⁻¹) y agua ultra pura (Invitrogen, cat.10977015). La PCR se realizó con el programa siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, 31 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 30 s, anillamiento a 62.5 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min), y una extensión final a 72 °C por 7 min, en un termociclador Labnet (modelo TC9610). Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando buffer TAE 0.5 X y teñido con bromuro de etidio (0.33 mg mL⁻¹). El tamaño de los amplicones se observó bajo luz UV en fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una cepa sospechosa se identifica como STEC O157:H7 cuando presenta el perfil molecular establecido en la Figura 1 (Feng *et al.* 2017). Los iniciadores para los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *ehxA* utilizados permiten detectar su presencia en todos los serotipos de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), por lo que es un método adecuado para establecer la presencia de STEC a partir de cultivos puros (Feng and Monday 2000). A partir de las heces de 17 bovinos asintomáticos se aislaron en agar Rainbow[®] O157, 131 cepas STEC sospechosas; este chromagar permite recuperar hasta un 70% de otras STEC no O157 (Zelyas *et al.* 2016).

El 100% (131 cepas) fueron bacilos cortos Gram negativos, el 93.1% (122 cepas) indol positivos y el 54.4% (71 cepas) fueron *Escherichia coli*-MUG positivos. El estudio molecular diferenció cuatro grupos de STEC establecidos por la presencia de los genes de patogenicidad (*stx1*, *stx2*, γ -*eaeA*, *ehxA*, +93 *uidA* y *rfB*) (Tabla 2), siendo este el primer reporte en México en presentarse con esta propuesta.

El gen *stx2* se detectó en el 19.1% (25 cepas), mientras que el gen *stx1* en el 6.9% (5 cepas). El 3.1% (4 cepas) presentaron el gen *rfB* y el gen *fliCH7*. Un aspecto importante a resaltar en las cepas positivas a STEC O157:H7 es que generalmente se

Tabla 1. Iniciadores utilizados para los análisis por PCR.

Gen	Secuencia (5' → 3')	Tamaño	Referencia
<i>stx2</i>	f-ATCCTATTCGCCGGGAGTTTACG	584 pb	
	r-GCGTCATCGTATACACAGGAGC		
<i>stx1</i>	f-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	348 pb	
	r-CACCAGACAATGTAACCGCTG		
γ - <i>eaeA</i>	f-ATTACCATCCACACAGACGGT	397 pb	(Feng <i>et al.</i> , 2017)
	r-ACAGCGTGGTTGGATCAACCT		
+93 <i>uidA</i>	f-GCGAAAACGTGGAATTGGG	252 pb	
	r-TGATGCTCCATCACTTCCTG		
<i>ehxA</i>	f-GTTTATTCTGGGGCAGGCTC	166 pb	
	r-CTTCACGTCACCATACATAT		
• <i>fliCH7</i>	f-GCTGCAACGGTAAGTGAT	984 pb	(Ateba and Mbebe, 2011)
	r-GGCAGCAAGCGGGTTGGT		
• <i>rfB</i>	f-TAAGTAATGGAACGGTTGCTCT	1000 pb	(Thapa <i>et al.</i> , 2012)
	r-CCCCACTCGTAAAATCCATC		

•: iniciadores utilizados en PCR punto final, pb: pares de bases.

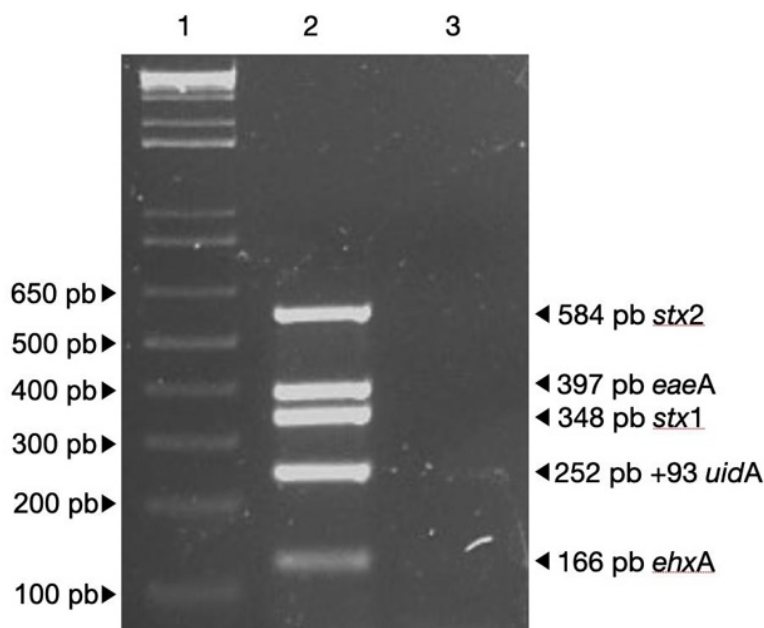


Figura 1. Detección de genes de patogenicidad de *E. coli* O157:H7 mediante PCR múltiple. Línea 1; marcador de peso molecular (1 Kb DNA plus ladder), línea 2; control positivo (*E. coli* O157:H7), línea 3; control negativo (*E. coli* ATCC 25922).

Tabla 2. Resultados de PCR en cepas aisladas a partir de heces de bovinos.

Perfil molecular n (%)	Aislados STEC				Aislados no STEC	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	<i>ehxA</i>	sin amplificación
<i>ehxA</i> , +93 <i>uidA</i> , γ - <i>eaeA</i> , <i>stx2</i> , <i>rfB</i> , <i>fliCH7</i>	<i>ehxA</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i>	<i>ehxA</i> , <i>stx2</i>	<i>ehxA</i> , <i>stx1</i>	<i>ehxA</i>	74 (56.5)	27 (20.6)
4 (3.1)	4 (3.1)	17 (12.9)	5 (3.8)			

*serotipo O157:H7

encuentran vinculadas a afecciones clínicas graves, como diarrea con sangre y SUH en humanos. Por lo que varios estudios han seleccionado los genes de los antígenos O157 y H7 como marcadores genéti-

cos para la identificación de STEC O157:H7 mediante PCR (Ateba and Mbebe 2011, Bertrand and Roig 2007, Thapa *et al.* 2012).

Algunos autores sugieren que la STEC

Tabla 3. Bovinos con presencia de STEC O157:H7 y no O157.

Clave del bovino	Raza	Clave de los aislados	Genes identificados	
			STEC	O157:H7
●H11	Charolais	H11-1	<i>stx2, ehxA</i>	-
●H24	Simmental Charbray	H24-1	<i>stx1, stx2, ehxA</i>	-
●H28	Simmental Charbray	H28-1, H28-2, H28-3, H28-5; H28-4, H28-6	<i>stx2, γ-eaeA, ehxA</i> <i>stx2, ehxA</i>	+93 <i>uidA, rfb, fliCH7</i>
M1	Simmental Charbray	M1-1, M1-4	<i>stx2, ehxA</i>	-
M3	Cruza ¹	M3-4, M3-5	<i>stx1, stx2, ehxA</i>	-
M4	Simbrah	M4-3	<i>stx2, ehxA</i>	-
M8	Cruza ¹	M8-1, M8-2, M8-3	<i>stx2, ehxA</i>	-
M10	Cruza ¹	M10-1, M10-2	<i>stx2, ehxA</i>	-
M11	Simbrah	M11-2; M11-3	<i>stx1, ehxA</i> <i>stx2, ehxA</i>	-
M12	Simbrah	M12-2	<i>stx2, ehxA</i>	-
M14	Simbrah	M14-4	<i>stx2, ehxA</i>	-
M17	Cruza ¹	M17-4	<i>stx1, ehxA</i>	-
M18	Simbrah	M18-4, M18-5, M18-7	<i>stx2, ehxA</i>	-
M21	Simbrah	M21-2	<i>stx1, ehxA</i>	-
M22	Simbrah	M22-3	<i>stx1, ehxA</i>	-
M27	Simbrah	M27-1	<i>stx1, ehxA</i>	-
M33	Simbrah	M33-3	<i>stx1, stx2, ehxA</i>	-

Clave bovino M/H: Macho/Hembra, ●; Bovinos con registro SINIIGA, Cruza¹ se refiere a la mezcla entre hembra y macho de las razas Simbrah, Simmental Charbray y Charolais.

O157:H7 puede ser excretada en las heces por manadas de terneros hasta en un 4% (McCabe *et al.* 2019); en el presente estudio solo se detectó el serotipo O157:H7 en el 1.6% de las muestras. Así mismo, el bovino es reportado como portador de cepas STEC no-O157 con índices del 0 al 60% dependiendo de la zona geográfica (Farrokh *et al.* 2013, Shridhar *et al.* 2017), en el presente estudio la raza Simbrah presentó el mayor índice de excreción de STEC no O157 con un 16.6% (Tabla 3). No existen reportes previos de STEC O157:H7 en el estado de Sonora; solamente se había reportado la presencia de la STEC O104 en heces de bovinos (Navarro *et al.* 2018), sin embargo nuestros resultados demuestran la presencia de STEC O157:H7 y STEC no O157, lo que sugiere que el contacto con las heces de bovinos asintomáticos pueden significar un riesgo hacia

la población en esta región del país.

Este es el primer reporte de la presencia de STEC O157:H7 en heces de bovinos asintomáticos en el Noroeste de México. Se identificaron 4 cepas STEC O157:H7 y 26 cepas STEC no O157, lo que sugiere que pueden constituir un vector importante de contaminación de otras matrices, sin embargo, esto deberá ser demostrado en estudios posteriores.

AGRADECIMIENTOS

Al ITSON por el financiamiento del proyecto PROFAPI ITSON (2018-1075). A la Dra. Gracia Gómez Anduro (CIBNOR-México) por la donación de la cepa control *E. coli* O157:H7.

LITERATURA CITADA

- Amézquita-López B, Quiñones B, Cooley B, León-Félix, J, Castro-del Campo N, Mandrell E, Jiménez, M, and Chaidez C (2012) Genotypic analyses of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from feces of domestic animals on rural farms in Mexico. PLOS ONE 7: e51565. DOI: 10.1371/journal.pone.0051565.
- Amézquita-López B, Soto-Beltrán M, Lee G, Yambao J, Quiñones B (2018) Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 51:

425-434.

- Ateba C, Mbewe M (2011) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. *Research in Microbiology* 162: 240-248.
- Bertrand R, Roig B (2007) Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157 application to municipal wastewater. *Water Research* 41: 6-1280.
- Blanchard P (2012) Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *The veterinary clinics of north America. Food Animal Practice* 28: 443-464.
- Callaway T, Edrington T, Loneragan G, Carr M, Nisbet D (2013) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) ecology in cattle and management based options for reducing fecal shedding. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology* 3: 39-69.
- Chase-Topping M, Gally D, Low C, Matthews L, Woolhouse M (2008) Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature Reviews Microbiology* 6: 904-912.
- Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D, Condrón R, De Reu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M, Hummerjohann J, Lindsay D, Miszczycha S, Moussiégt S, Verstraete K, and Cerf O (2013) Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology* 162: 190-212.
- Feng P, Monday S (2000) Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Molecular and Cellular Probes* 14: 333-337.
- Feng P, Weagnant S, Jinneman K (2017) Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: *Bacteriological analytical manual (BAM)*. Food and Drug Administration Publishers. New Hampshire, USA. pp: 1-30.
- Heredia N, García S (2018) Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition* 4: 250-255.
- Joseph A, Cointe A, Mariani Kurkdjian P, Rafat C, Hertig A (2020) Shiga Toxin-associated hemolytic uremic syndrome: A narrative review. *Toxins* 12: 67. Doi: 10.3390/toxins12020067.
- McCabe E, Burgess C, Lawal D, Whyte P, Duffy G (2019) An investigation of shedding and super-shedding of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 and *E. coli* O26 in cattle presented for slaughter in the Republic of Ireland. *Zoonoses and Public Health* 66: 83-91.
- Mir R, Brunelle W, Alt P, Arthur M, Kudva T (2020) Supershed *Escherichia coli* O157:H7 Has potential for increased persistence on the rectoanal junction squamous epithelial cells and antibiotic resistance. *International Journal of Microbiology* 2020 Article ID 2368154. Doi 10.1155/2020/2368154 2368154.
- Navarro A, Cauich-Sánchez P, Trejo A, Gutiérrez A, Díaz S, Díaz C, Cravioto A, Eslava C (2018) Characterization of diarrheagenic strains of *Escherichia coli* isolated from cattle raised in three regions of Mexico. *Frontiers in Microbiology* 9 Article 2373. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02373.
- Nguyen T, Van Giau V, Vo K (2016) Multiplex PCR for simultaneous identification of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in food. *3 Biotech* 6: 205. Doi: 10.1007/s13205-016-0523-6.
- OIE (2018) *Escherichia coli* verocitotoxigenica. In: *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres*. www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/. Fecha de consulta: 17 de enero de 2019
- Schuller S (2011) Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins* 3: 626-639

- Shridhar P, Siepker C, Noll L, Shi X, Nagaraja T, Bai J (2017) Shiga toxin subtypes of non-O157 *Escherichia coli* serogroups isolated from cattle feces. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 121. Doi: 10.3389/fcimb.2017.00121.
- SIAP (2018) Atlas Agroalimentario. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018. Fecha de consulta: 07 de enero de 2019.
- Soledad-Cadona J, Bustamante A, González J, Mariel-Sanso A (2018) Pathogenicity islands distribution in Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Genes* 9(2): 81. Doi: 10.3390/genes9020081.
- Swaggerty C, Corcionivoschi N, Ricke S, Callaway R (2018) The first 30 years of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle production: incidence, preharvest ecology, and management. In: Ricke SC, Atungulu GG, Rainwater CE, Park SH (ed). *Food and feed safety systems and analysis*. Academic Press. pp: 117-131.
- Terajima J, Izumiya H, Hara-Kudo Y, Ohnishi M (2017) Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* and foodborne disease: A review. *Food Safety* 5: 35-53
- Thapa S, Reum Han A, Mo Cho J, Hur J (2012) Multiplex PCR and DNA array for the detection of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. targeting virulence-related genes. *Annals of Microbiology* 63: 725-731
- Zelyas N, Poon A, Patterson-Fortin L, Johnson R, Lee W, Chui L (2016) Assessment of commercial chromogenic solid media for the detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 85: 302-308