

TESIS DE DOCTORADO

TIPADO MOLECULAR DE CEPAS DE

ESCHERICHIA COLI

VEROTOXIGÉNICAS O157 Y NO

O157 AISLADAS DE PACIENTES,

RESERVORIOS Y ALIMENTOS

Cecilia López Capón

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y PARASITARIA

LUGO

2018



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Tipado molecular de cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicas O157 y no O157 aisladas de pacientes, reservorios y alimentos

Dña. Cecilia López Capón

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Lugo, a 8 de marzo de 2018

Fdo. Cecilia López Capón





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Tipado molecular de cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicas O157
y no O157 aisladas de pacientes, reservorios y alimentos

Dña. Azucena Mora Gutiérrez
D. Miguel Blanco Álvarez

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Cecilia López Capón**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Lugo, a 8 de marzo de 2018.

Fdo. Azucena Mora Gutiérrez

Fdo. Miguel Blanco Álvarez



El presente estudio ha sido financiado por:

Los proyectos nacionales AGL2008-02129 del Ministerio de Educación y Ciencia y Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER), y AGL2016-79343-R de la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y FEDER; junto con los programas de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas CN2012/303 y ED431C 2017/57 de la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria.





AGRADECIMIENTOS

En esta Tesis no podrían faltar unas líneas dedicadas a todas aquellas personas que de forma desinteresada me han ayudado a que este trabajo viera la luz. Con su colaboración y aportaciones esta Tesis se ha visto enriquecida, por todo ello, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a:

Azucena Mora, por la dirección de la tesis, por su colaboración en los estudios de electroforesis en campos pulsados, MLST y en la elaboración de la memoria. Pero sobre todo por sus tantos y buenos consejos, por toda su ayuda y apoyo durante todos estos años y por su continua preocupación y dedicación a este trabajo.

Miguel Blanco, por la dirección de la tesis, por su ayuda en el análisis de secuencias genéticas, por la confianza depositada en mí durante todos estos años y por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas.

Jorge Blanco, por sus aportaciones a esta tesis, por la confianza depositada en mí durante todos estos años y por haberme introducido en el mundo de la Investigación.

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

Daphne Díaz, por su ayuda con las inevitables repeticiones de última hora en el laboratorio.

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

Alexandra Herrera, Ghizlane Dahbi, Susana Viso, Rosalía Mamani, Juan Marzoa, Isidro García, Vanessa García, Saskia Flament y Liliana Costoya por su amistad, por sus aportaciones a esta tesis y por animarme a terminar este trabajo.

María Pilar Alonso García, Julia Pita Carretero, Fernando García Garrote, Amparo Coira Nieto, de la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) de Lugo, por su ayuda en la recogida de muestras de origen clínico.

Al grupo de Aurora Echeita (primero) y Silvia Herrera (después), del Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III de Madrid, por su inestimable ayuda en el fagotipado de las cepas O157.

Mis padres, **Cesáreo** y **Concha** porque siempre me han ayudado y apoyado en todas mis decisiones y porque han sido y son un ejemplo, referencia y espejo en el cual me gustaría verme reflejada siempre.

Mi hermana **Sabina** y a **Javier** por sus ánimos a lo largo de todos estos años de estudio, por ayudarme, apoyarme y por estar siempre a mi lado.

Mis sobrinos **Nico** y **Lara** por ser capaces de arrancarme una sonrisa aún en los momentos más bajos.

Antonio y **Pura** por aguantar mis “invasiones de papeles” de estos últimos años y por sus ánimos.

Y por último, pero no por eso menos importante, a ti **Miguel**, agradecerte todo lo que me has ayudado en la realización de esta tesis, por tu apoyo incondicional y por estar ahí cuando más lo necesito.

Muchas gracias a **TODOS**!!





A mi familia.



ÍNDICE



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y TÉRMINOS	IV
RESUMENES.....	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>.....	1
1.2. CLASIFICACIÓN SEROLÓGICA	3
1.3. ESTRUCTURA FILOGENÉTICA.....	3
1.4. GRUPOS PATÓGENOS.....	6
1.5. <i>E. COLI</i> ENTEROPATOGÉNICOS (ECEP)	10
1.6. <i>E. COLI</i> VEROTOXIGÉNICOS (ECVT).....	13
1.6.1. FACTORES DE VIRULENCIA.....	17
1.6.1.1. VEROTOXINAS (VT1 Y VT2).....	18
1.6.1.2. OTROS FACTORES DE VIRULENCIA.....	19
1.6.2. ECVT: IMPORTANTES PATÓGENOS EMERGENTES	28
1.6.2.1. ECVT O157 Y NO O157	29
1.6.2.2. ECVT O157	30
1.6.2.3. ECVT NO O157	33
1.6.3. RESERVORIOS Y FUENTES DE TRANSMISIÓN DE LOS ECVT	36
1.6.3.1. GANADO BOVINO Y PEQUEÑOS RUMIANTES: PRINCIPALES RESERVORIOS.....	36
1.6.3.2. OTROS ANIMALES COMO RESERVORIO DE ECVT.....	40
1.6.3.3. PRINCIPALES ALIMENTOS IMPLICADOS EN LA TRANSMISIÓN	42
1.6.4. ECVT O104: EL BROTE ALEMÁN	46
1.6.5. ECVT: SITUACIÓN EN ESPAÑA	48
1.6.6. CARACTERIZACIÓN Y TIPADO DE ECVT.....	53
1.6.6.1. MÉTODOS FENOTÍPICOS	53
1.6.6.1.1. SEROTIPADO.....	53
1.6.6.1.2. FAGOTIPADO	54
1.6.6.2. TIPADO MOLECULAR.....	57
1.6.6.2.1. CARACTERIZACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA MEDIANTE PCR	59
1.6.6.2.2. ELECTROFORESIS EN CAMPOS PULSANTES (PFGE)	61
1.6.6.2.3. MLVA.....	65
1.6.6.2.4. MLST.....	66
1.6.6.3. SECUENCIACIÓN GENÓMICA MASIVA	70
1.6.6.4. PROTEÓMICA: MALDI-TOF	72
2. OBJETIVOS.....	77
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
3.1 CONSERVACIÓN Y CEPAS CONTROL	81
3.2. COLECCIÓN DE ESTUDIO.....	83

3.3. CULTIVO DIFERENCIAL Y BIOTIPADO	85
3.4. SEROTIPADO	87
3.4.1. DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO O.....	87
3.4.2. DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO H.....	89
3.4.3. ASIGNACIÓN DE SEROPATOTIPO.....	91
3.5. FAGOTIPADO	91
3.6. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN	91
3.6.1. GENES DE VIRULENCIA	94
3.6.2. TIPADO DE VEROTOXINAS.....	96
3.6.3. TIPADO DE INTIMINAS.....	98
3.6.4. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS	100
3.7. MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)	101
3.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MEDIANTE EL ALGORITMO NEIGHBOR-JOINING	102
3.9. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MEDIANTE EL ALGORITMO eBURST	102
3.10. PERFILES DE MACRORRESTRICCIÓN OBTENIDOS MEDIANTE PFGE	102
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y DETECCIÓN DE GENES <i>TERB/TERD</i>	111
4.2. ASIGNACIÓN DE SEROPATOTIPOS	131
4.3. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS	132
4.4. SECUENCIAS TIPO (ST)	133
4.5. DEFINICIÓN DE GRUPOS CLONALES	135
4.5.1. GRUPO CLONAL O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ST1804/ST1825/ST1826/ST1833.....	136
4.5.2. GRUPO CLONAL O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29	149
4.5.3. GRUPOS CLONALES O146:[H21]-B1-ST442 Y O146:[H28]-F-ST738	158
4.5.4. OTROS GRUPOS CLONALES	167
4.5.4.1. GRUPOS CLONALES O5:HNM-A-ST342, O5:HNM-A-ST1797 Y O5:HNM-B1-ST447..	167
4.5.4.2. GRUPO CLONAL O8:H2-B1-ST1798/ST1834	172
4.5.4.3. GRUPOS CLONALES O20:H19-B1-ST192 Y O20:H19-B1-ST205/ST443	175
4.5.4.4. GRUPO CLONAL O75:[H8]-B1-ST13.....	178
4.5.4.5. GRUPO CLONAL O76:H19-B1-ST675.....	181
4.5.4.6. GRUPO CLONAL O77:H41-E-ST720.....	184
4.5.4.7. GRUPOS CLONALES O91:[H14]/HNM-B1-ST33 Y O91:[H21]-B1-ST442.....	186
4.5.4.8. GRUPO CLONAL O98:[H21]-B1-ST306.....	190
4.5.4.9. GRUPO CLONAL O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967.....	192
4.5.4.10. GRUPOS CLONALES O104:H7-B1-ST1817/2283 Y O104:H21-B1-ST672.....	197
4.5.4.11. GRUPO CLONAL O111:[H8]-B1-ST16.....	201
4.5.4.12. GRUPO CLONAL O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821.....	205
4.5.4.13. GRUPO CLONAL O117:HNM-B1-ST1816/ST1817	209
4.5.4.14. GRUPO CLONAL O118:H16/HNM-B1-ST21.....	212
4.5.4.15. GRUPO CLONAL O121:H19-B1-ST655.....	215
4.5.4.16. GRUPO CLONAL O128:[H2]-B1-ST25.....	218
4.5.4.17. GRUPO CLONAL O145:[H28]-E-ST32.....	222
4.5.4.18. GRUPOS CLONALES O156:[H10]-B1-ST441 Y O156:[H25]-B1-ST300	225

4.5.4.19. GRUPO CLONAL O166:H28-E-ST1819/ST1824.....	229
4.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	232
4.6.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MEDIANTE EL ALGORITMO NEIGHBOR-JOINING.....	232
4.6.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MEDIANTE EL ALGORITMO EBURST	234
4.6.2.1. ESTRUCTURA Y RELACIONES GENÉTICAS DE LA POBLACIÓN DE ECVT	234
4.6.2.2. ESTRUCTURA Y RELACIONES GENÉTICAS DENTRO DE LA POBLACIÓN DE <i>E. COLI</i>	245
5. CONCLUSIONES.....	257
6. BIBLIOGRAFÍA.....	261



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y TÉRMINOS

A/E	Del inglés “ <i>attaching and effacing</i> ”	EAST1	Del inglés “ <i>Enteraggregative ST1</i> ”
ADN	Ácido desoxirribonucleico	ECAD	<i>E. coli</i> con adherencia difusa
adK	Gen de la adenilato quinasa (del inglés “ <i>adenylate kinase</i> ”)	ECAE	<i>E. coli attaching and effacing</i>
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición	ECAI	<i>E. coli</i> adherente invasivo
AFLP	Del inglés “ <i>Amplified fragment length polymorphism</i> ”	ECDC	<i>European Centre for Disease Control</i>
APEC	<i>E. coli</i> patógenos aviáres (del inglés “ <i>Avian pathogenic E. coli</i> ”)	ECDP	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico	ECEAgg	<i>E. coli</i> enteroagregativo
BFP	Del inglés “ <i>bundle-forming pilus</i> ”	ECEH	<i>E. coli</i> enterohemorrágico
BURST	Del inglés “ <i>based upon related sequence types</i> ”	ECEI	<i>E. coli</i> enteroinvasivo
CC	Complejo clonal	ECEP	<i>E. coli</i> enteropatogénico
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	ECEPa	<i>E. coli</i> enteropatogénico atípico
CFA	Factor antigénico de colonización	ECEPt	<i>E. coli</i> enteropatogénico típico
CH	Colitis Hemorrágica	ECET	<i>E. coli</i> enterotoxigénico
CHUS	Complejo Hospitalario Universitario de Santiago	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
cnf	Gen del factor citotóxico necrotizante	ECSUH	<i>E. coli</i> asociado a SUH
CSB	Del inglés “ <i>Cell Suspension Buffer</i> ”	ECVT	<i>E. coli</i> verotoxigénico
CTX-M	Cefotaximasas	EDTA	Del inglés “ <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> ”
DLV	Del inglés “ <i>doble locus variants</i> ”	EE.UU.	Estados Unidos
dNTP	Del inglés “ <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> ”	EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EAE	Del inglés “ <i>Attaching and effacing protein</i> ”	E-HlyA	Enterohemolisina
eae	Gen que codifica para la intimina	<i>E-hlyA</i>	Gen de la enterohemolisina
EAF	Del inglés “ <i>EPEC adherence factor</i> ”	espP	Gen de la serina proteasa
		ExPEC	<i>E. coli</i> patógenos extraintestinales
		FAFLP	Del inglés “ <i>Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism</i> ”
		fumC	Gen que codifica para la fumarato hidratasa (del inglés “ <i>fumarate hydratase</i> ”)

FV	Factor humano de coagulación V	MEGA	Del inglés “ <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> ”
gyrB	Gen de la DNA girasa (del inglés “ <i>DNA gyrase</i> ”)	MESGEM	<i>Members of the European Study Group on Epidemiological Markers</i>
hlyA	Gen de la hemolisina	MIL	Del inglés “ <i>Motility Indole Lysine</i> ”
HNM	Antígeno H no móvil	MLEE	Del inglés “ <i>multilocus enzyme electrophoresis</i> ”
HNT	Antígeno H no tipable	MLST	Del inglés “ <i>Multilocus sequence typing</i> ”
HULA	Hospital Universitario Lucus Augusti	MLVA	Del inglés “ <i>Multilocus variable number of tandem repeat analysis</i> ”
HUS	Del inglés “ <i>hemolytic uremic syndrome</i> ”	MST	Del inglés “ <i>minimum spanning tree</i> ”
icd	Gen que codifica para la isocitrato deshidrogenasa (del inglés “ <i>isocitrate /isopropylmalate dehydrogenase</i> ”)	NCBI	Del inglés “ <i>National Center for Biotechnology Information</i> ”
iutA	Gen de la aerobactina	NJ	Neighbor-Joining
katP	Gen de la enzima catalasa-peroxidasa	NMEC	<i>E. coli</i> causantes de la meningitis del recién nacido
LEE	Del inglés “ <i>locus of enterocyte effacement</i> ”	NR	No realizado
Ler	Del inglés “ <i>LEE encoded regulator</i> ”	OEP	Del inglés “ <i>Outer Membrane Efflux Protein</i> ”
LPF	Del inglés “ <i>long polar fimbriae</i> ”	OMS	Organización Mundial de la Salud
LPS	Lipopolisacárido	ONT	Antígeno O no tipable
LREC	Laboratorio de Referencia de <i>E. coli</i>	ORF	Del inglés “ <i>open reading frame</i> ”
MACL	Agar MacConkey lactosa	PAI	Del inglés “ <i>pathogenicity island</i> ”
MACS	Agar MacConkey sorbitol	PCR	Del inglés “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
MACSTC	Agar MacConkey sorbitol con telurito y cefixima	PCR-RFLP	PCR combinada con la técnica de RFLP
MALDI-TOF	Del inglés “ <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> y TOF (<i>Time-Of-Flight</i>)”	Per	Del inglés “ <i>plasmid-encoded regulator</i> ”
MALDI-TOF MS	Del inglés “ <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry</i> ”	PFGE	Del inglés “ <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> ”
mdh	Gen de la malato deshidrogenasa (del inglés “ <i>malate dehydrogenase</i> ”)	PTT	Púrpura trombocitopénica trombótica

purA	Gen de la “ <i>adenylosuccinate dehydrogenase</i> ”	SUH	Síndrome urémico hemolítico
recA	Gen que codifica para la proteína RecA (Del inglés “ <i>ATP/GTP binding motif</i> ”)	T3SS	Del inglés “ <i>Type 3 Secretion System</i> ”
RFLP	Del inglés “ <i>Restriction fragment length polymorphism</i> ”	TBE	Buffer Tris-Borate EDTA
RIAIDT	<i>Rede de Infraestruturas de Apoio á Investigación e ao Desenvolvemento Tecnolóxico</i>	TE	Buffer Tris-EDTA
RT-PCR	Del inglés “ <i>real time PCR</i> ”	ter	Gen de resistencia al telurito
Saa	Adhesina autoaglutinante de STEC	Tir	Del inglés “ <i>Translocated intimin receptor</i> ”
saa	Gen de la adhesina autoaglutinante	TLV	Del inglés “ <i>triple locus variants</i> ”
SEPEC	<i>E. coli</i> septicémico	TSA	Del inglés “ <i>Tryptone Soy Agar</i> ”
SIM	Separación Inmunomagnética	TSB	Del inglés “ <i>Tryptone Soy Broth</i> ”
SLV	Del inglés “ <i>single locus variants</i> ”	UE	Unión Europea
SNP	Del inglés “ <i>single nucleotide polymorphism</i> ”	UFC	Unidades formadoras de colonias
spp.	Especie	UPEC	<i>E. coli</i> uropatógeno
ST	Del inglés “ <i>sequence type</i> ”	UPGMA	Del inglés “ <i>unweighted pair group method using arithmetic averages</i> ”
ST Cplx	Del inglés “ <i>sequence type complex</i> ”	USC	Universidad de Santiago de Compostela
stcE	Gen de la metaloproteasa	VT	Verotoxina
STEC	Del inglés “ <i>Shiga-like toxin producing E. coli</i> ”	VTEC	Del inglés “ <i>verotoxin-producing Escherichia coli</i> ”
Stx1/Stx2	Del inglés “ <i>Shiga toxins</i> ”, toxinas Shiga Stx1 y Stx2	vt1	Gen responsable de la verotoxina VT1 (también denominado <i>stx1</i>)
SubAB	Citotoxina subtilasa	vt2	Gen responsable de la verotoxina VT2 (también denominado <i>stx2</i>)
subAB	Gen de la subtilasa	WGS	Del inglés “ <i>whole genome sequencing</i> ”

RESUMENES



RESUMEN

El grupo de los *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT), y especialmente las cepas del serotipo O157:H7, son importantes patógenos emergentes implicados en patologías graves en seres humanos, como son la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico. En el presente estudio se caracterizaron un total de 820 cepas de *Escherichia coli*, en su mayoría verotoxigénicas, de origen humano, bovino, ovino, caprino, de animales silvestres, y de alimentos (carne de vacuno, leche de oveja, productos agrícolas), incluidos los serotipos más frecuentemente implicados en procesos clínicos humanos por ECVT, y aisladas en España entre los años 1980 y 2011. Se determinaron sus filogrupos, tipos y subtipos de los genes *vt*, tipos y subtipos del gen *eae*, genes de virulencia adicionales, las secuencias tipo (ST) y pulsotipos (PFGE), con objeto de definir los grupos clonales de ECVT pertenecientes a los serotipos más prevalentes en España, así como conocer el papel de los reservorios animales o alimentos derivados de animales en las infecciones humanas por ECVT. Entre las 820 cepas se identificaron 29 grupos clonales pertenecientes a 3 filogrupos (24 al filogrupo B1, 4 al E y 1 al F), con 41 ST asociadas; 14 de esas 41 ST fueron asignadas por primera vez a las cepas de este estudio. Según nuestros resultados, O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29, O146:[H21]-B1-ST442 y O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ST1804/ST1825/ST1826/ST1833 serían los grupos clonales más ampliamente adaptados a diferentes hospedadores (ovino, bovino, caprino, diferentes especies de animales silvestres), con éxito en la transmisión alimentaria al hombre a través de alimentos derivados de los rumiantes de producción, dada la alta similitud encontrada entre los aislados de origen humano y animal. Demostramos además la alta identidad entre cepas de origen clínico humano y animal de O5:HNM-A-ST342 (animales de origen silvestre y vacuno), O5:HNM-B1-ST447 (pequeños rumiantes), O76:H19-B1-ST675 (pequeños rumiantes y silvestres), O91:[H14]/HNM-B1-ST33 (vacuno), O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967 (vacuno), O111:[H8]-B1-ST16 (vacuno), O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821 (vacuno), O118:H16/HNM-B1-ST21 (vacuno), O121:H19-B1-ST655 (silvestres), O128:[H2]-B1-ST25 (ovino), O145:[H28]-E-ST32 (vacuno y silvestres), O156:[H25]-B1-ST300 (vacuno), O166:H28-E-ST1819/ST1824 (vacuno y pequeños rumiantes). Por último, constatamos que para la correcta caracterización de la estructura filogenética de *E. coli* es fundamental el uso de diferentes aproximaciones. En nuestro caso, la combinación de los datos obtenidos mediante el esquema de filogrupos de Clermont (basado en la *cuadriplex* PCR), el algoritmo Neighbor-Joining, el algoritmo eBURST, junto con el análisis de los perfiles de macrorrestricción de las cepas obtenidos mediante PFGE, nos permitió deducir las relaciones clonales de nuestra colección.

PALABRAS CLAVE: *E. coli*, ECVT, MLST, PFGE, O157:H7, no O157

RESUMO

O grupo dos *Escherichia coli* verotoxixénicos (ECVT), e especialmente as cepas do serotipo O157:H7, son importantes patóxenos emerxentes implicados en patoloxías graves en seres humanos, como son a colitis hemorráxica e o síndrome urémico hemolítico. No presente estudo caracterizáronse un total de 820 cepas de *Escherichia coli*, na súa maioría verotoxixénicas, de orixe humana, bovina, ovina, caprina, de animais silvestres, e de alimentos (carne de vacún, leite de ovella, produtos agrícolas), incluídos os serotipos máis frecuentemente implicados en procesos clínicos humanos por ECVT, e illadas en España entre os anos 1980 e 2011. Determináronse os seus filogrupos, tipos e subtipos dos xenes *vt*, tipos e subtipos do xen *eae*, xenes de virulencia adicionais, as secuencias tipo (ST) e pulsotipos (PFGE), co obxecto de definir os grupos clonais de ECVT pertencentes aos serotipos máis prevalentes en España, así como coñecer o papel dos reservorios animais ou alimentos derivados de animais nas infeccións humanas por ECVT. Entre as 820 cepas identificáronse 29 grupos clonais pertencentes a 3 filogrupos (24 ao filogrupo B1, 4 ao E e 1 ao F), con 41 ST asociadas; 14 desas 41 ST foron asignadas por primeira vez ás cepas deste estudo. Segundo os nosos resultados, O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29, O146:[H21]-B1-ST442 e O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ST1804/ST1825/ST1826/ST1833 serían os grupos clonais máis amplamente adaptados a diferentes hospedadores (ovino, bovino, caprino, diferentes especies de animais silvestres), con éxito na transmisión alimentaria ao home a través de alimentos derivados dos ruminantes de produción, dada a alta similitude atopada entre os illados de orixe humana e animal. Demostramos ademais a alta identidade entre cepas de orixe clínica humana e animal de O5:HNM-A-ST342 (animais de orixe silvestre e vacún), O5:HNM-B1-ST447 (pequenos ruminantes), O76:H19-B1-ST675 (pequenos ruminantes e silvestres), O91:[H14]/HNM-B1-ST33 (vacún), O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967 (vacún), O111:[H8]-B1-ST16 (vacún), O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821 (vacún), O118:H16/HNM-B1-ST21 (vacún), O121:H19-B1-ST655 (silvestres), O128:[H2]-B1-ST25 (ovino), O145:[H28]-E-ST32 (vacún e silvestres), O156:[H25]-B1-ST300 (vacún), O166:H28-E-ST1819/ST1824 (vacún e pequenos ruminantes). Por último, constatamos que para a correcta caracterización da estrutura filoxenética de *E. coli* é fundamental o uso de diferentes aproximacións. No noso caso, a combinación dos datos obtidos mediante o esquema de filogrupos de Clermont (baseado na *cuadruplex* PCR), o algoritmo Neighbor-Joining, o algoritmo eBURST, xunto coa análise dos perfís de macrorrestricción das cepas obtidos mediante PFGE, permitiunos deducir as relacións clonais da nosa colección.

PALABRAS CHAVE: *E. coli*, ECVT, MLST, PFGE, O157:H7, non O157

SUMMARY

The Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) group, and especially VTEC strains belonging to serotype O157:H7, are important emerging pathogens implicated in serious human pathologies such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. In the present study, a total of 820 *E. coli* strains, most of them verotoxigenic and including the serotypes most frequently implicated in human clinical processes, were characterized. The collection had been obtained in Spain between 1980 and 2011 from different sources: human, bovine, ovine, caprine, wildlife, as well as from food (beef, sheep milk, agricultural products). Their phylogroups, types and subtypes of *vt* and *eae* genes, additional virulence genes, sequence types (ST) and pulsetypes (PFGE) were determined to define the VTEC clonal groups belonging to the most prevalent serotypes in Spain, as well as to establish the role of animals or animal-derived food as reservoirs of VTEC causing human infections. Among the 820 strains, 29 clonal groups belonging to 3 phylogroups were identified (24 to phylogroup B1, 4 to E, and 1 to F), with 41 associated STs. Fourteen of those 41 STs were assigned for the first time to the strains of this study. According to our results O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29, O146:[H21]-B1-ST442 and O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ST1804/ST1825/ST1826/ST1833 would be the clonal groups most widely adapted to different hosts (sheep, cattle, goats, different wild animal species), with success in food transmission to humans through food derived from production ruminants, given the high similarity found between strains of human and animal origins. We also demonstrated a high identity between strains of clinical human and animal origin belonging to the clonal groups: O5:HNM-A-ST342 (wild animals and cattle), O5:HNM-B1-ST447 (small ruminants), O76:H19-B1-ST675 (small ruminants and wild animals), O91:[H14]/HNM-B1-ST33 (cattle), O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967 (cattle), O111:[H8]-B1-ST16 (cattle), O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821 (cattle), O118:H16/HNM-B1-ST21 (cattle), O121:H19-B1-ST655 (wild animals), O128:[H2]-B1-ST25 (sheep), O145:[H28]-E-ST32 (cattle and wild animals), O156:[H25]-B1-ST300 (cattle), O166:H28-E-ST1819/ST1824 (cattle and small ruminants). Finally, we found that it is necessary the use of different approaches for an accurate phylogenetic analysis of the *E. coli* population. The combination of the data obtained by means of the Clermont phylogroup scheme (based on the quadriplex PCR assay), the Neighbor-Joining method, the eBURST algorithm, together with the analysis of the PFGE macrorestriction profiles allowed us to infer the clonal relationships within our collection.

KEYWORDS: *E. coli*, STEC, MLST, PFGE, O157:H7, non-O157



1. INTRODUCCIÓN



1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *ESCHERICHIA COLI*

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

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

Al tratarse de una bacteria intestinal, la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales, *E. coli* se excreta diariamente con las heces de manera abundante, entre 10^8 y 10^9 *E. coli*/g de heces. Como la masa fecal media de un individuo sano es de unos 200 g, esta masa contendrá 2×10^{10} - 10^{11} *E. coli*. Por tanto, la población humana excreta diariamente sobre 10^{20} - 10^{21} *E. coli* al medio ambiente. Esta cantidad se ve incrementada por las excreciones de los animales. Un alto porcentaje de estos microorganismos eliminados sobrevive, al menos inicialmente (McDowell *et al.* 2001; Heinikainen *et al.* 2007; Williams *et al.* 2007; Geue *et al.* 2009; Sekse *et al.* 2009; Chauret, 2011; Yao *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013). Por este motivo, es posible su presencia en el medio ambiente, agua y alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Hartl y Dykhuizen, 1984) (Figura 1).

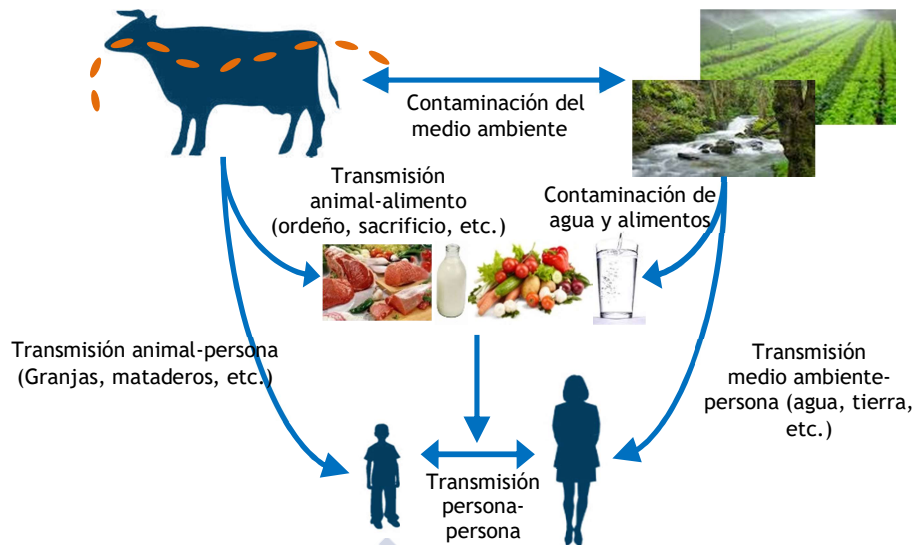


Figura 1. Ciclo de contaminación de *E. coli*. Adaptada de <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/pathogenesis.asp>

Aunque la mayoría de los *E. coli* forman parte de la microbiota normal de los mamíferos, donde juegan un papel inocuo o incluso beneficioso para el hospedador, algunas cepas de *E. coli* se consideran patógenas, debido a la adquisición de factores de virulencia específicos que les confieren la capacidad de producir una amplia variedad de infecciones, tanto de tipo entérico (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico o enfermedad de los edemas) como extraintestinal (infecciones del tracto urinario, bacteriemias, septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas). Por lo tanto, las cepas de *E. coli* se clasificarían en 3 categorías en función del grado de patogenicidad: comensales, patógenas entéricas y patógenas extraintestinales (Russo y Jonson, 2000).

Se estima que al año se producen en el mundo 1,7 billones de casos de diarreas en seres humanos, de los cuales una cuarta parte son causados por *E. coli* y el número de muertes en el mundo debidas a infecciones provocadas por este microorganismo se estiman en más de 700.000 al año, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo (aproximadamente 375.000 niños menores de 5 años mueren al año por *E. coli*) (Nataro y Kaper, 1998; OMS, 2005; UNICEF/OMS, 2009; Walker *et al.* 2013). Además, es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias en seres humanos. En animales domésticos las colibacilosis son muy frecuentes, incidiendo esencialmente en animales de pocos días de edad y en recién destetados, y ocasionan importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado bovino, porcino y ovino, así como en la cría intensiva de aves y conejos (Blanco *et al.* 1991, 2001, 2003a, 2003b; Blanco y Blanco, 1993; Blanco J.E. *et al.* 1996a). Mientras que en terneros, lechones, corderos y gazapos *E. coli* suele producir diarrea, en aves provoca fundamentalmente infecciones respiratorias

(aerosaculitis) y septicemias. Además *E. coli* puede causar en rumiantes, ganado porcino, perros y gatos colisepticemias en neonatos, infecciones urinarias y mamitis.

1.2. CLASIFICACIÓN SEROLÓGICA

En 1947, Kauffmann propone una forma de diferenciar las cepas de *E. coli* utilizando la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos de la membrana externa de la pared celular), K (capsulares) y H (flagelares) (Figura 2). Esta forma de clasificación serológica resultó ser muy útil en los estudios epidemiológicos y de patogénesis de *E. coli*, facilitando la diferenciación entre cepas patógenas e inoñas y permitiendo la detección de brotes.

En la actualidad se reconocen del orden de 180 antígenos O (O1 a O185), 72 antígenos K (K1 a K103) y 56 antígenos H (H1 a H56), y aunque existen numerosas combinaciones o serotipos O:K:H, tan solo algunas son frecuentes entre las cepas patógenas. La determinación de los antígenos O y H se realiza por técnicas de aglutinación, mientras que la identificación del antígeno K es recomendable que se realice por contrainmunolectroforesis. Debido a las reacciones cruzadas entre los antígenos O y K de diferentes cepas de *E. coli* con los antígenos de otros géneros de enterobacterias, se recomienda utilizar antisueros adsorbidos para evitar falsas reacciones de aglutinación (Guinée *et al.* 1972, 1981; Orskov y Orskov, 1984; Ewing, 1986).

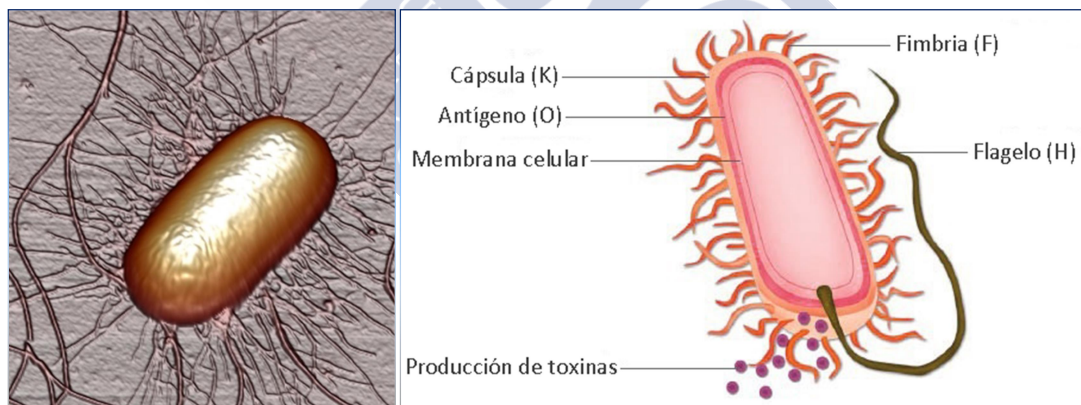


Figura 2. Fotografía de la bacteria *Escherichia coli* y esquema en el que se representan los principales antígenos de superficie (O, K y H) y algunos factores de virulencia (Fuente: <http://www.icmm.csic.es/spmage/spmagegallery.php> y esquema adaptado de Fairbrother, 2015)

1.3. ESTRUCTURA FILOGENÉTICA

E. coli es una de las especies bacterianas más versátiles que existen. Como se ha indicado, alterna entre su hábitat primario, el intestino de los vertebrados, donde vive como comensal (Tenailon *et al.* 2010), y el secundario, agua y sedimentos (Savageau, 1983). También puede actuar como patógeno extra e intrainestinal en humanos y muchas otras especies animales (Kaper *et al.* 2004). Esta diversidad de hábitats es debida a la gran plasticidad de su genoma,

que presenta pérdidas y ganancias de genes a través del mecanismo de transferencia horizontal (Rasko *et al.* 2008; Touchon *et al.* 2009).

La longitud del cromosoma de *E. coli* puede variar ampliamente, de 4,3 a 6,2 Mb, codificando entre 4.084 y 6.453 proteínas (Tourret y Denamur, 2016). Esta enorme diversidad se estructura en un conjunto de menos de 2.000 genes que constituyen el genoma esencial (*core genome*), presente en todas las cepas de la especie, y un conjunto variable de genes accesorios (*accessory genome*) que incluye todos los genes que codifican elementos bacteriófagos, determinantes de virulencia y resistencia adquirida a los antimicrobianos. El conjunto de genes del *core* y accesorios identificados en *E. coli* conforman su pangenoma, que comprende más de 22.000 genes y que continuará aumentando a medida que se secuencien más cepas (Robins-Browne *et al.* 2016). Todos los genes codificadores de la virulencia de *E. coli* se adquirieron muy probablemente mediante transferencia horizontal de genes de otras bacterias (Leimbach *et al.* 2013). Por lo tanto, cada cepa de *E. coli* comprende un mosaico de genes básicos y accesorios, siendo estos últimos (incluidos los determinantes de virulencia de los *E. coli* diarregénicos) transmisibles entre cepas. Por esta razón, es inevitable que continúen surgiendo nuevos patotipos, ya sea a través de la nueva incorporación de determinantes de virulencia de *E. coli*, como en el caso de los ECVT O157 (Feng *et al.* 1998) y los *E. coli* enteroagregativos (ECEAgg) productores de toxina Shiga (Rohde *et al.* 2011), o a través de la adquisición de genes de virulencia de otras especies bacterianas. La estructura genética de una especie puede oscilar de clonal, generando su variedad casi exclusivamente por mutación (diversidad vertical), a panmítica, reflejando un elevado ratio de recombinación (variedad horizontal).

Los primeros intentos para determinar la estructura de la población genética de *E. coli* se basaron en los serotipos (antígenos O, K y H) (Orskov *et al.* 1976) y los polimorfismos enzimáticos metabólicos estudiados por electroforesis enzimática multilocus (*multilocus enzyme electrophoresis*, MLEE) (Selander y Levin 1980). Con dichos parámetros solo se consiguieron determinar algunas asociaciones de combinaciones antigénicas O:K:H o de alelos enzimáticos, localizadas en distintos hospedadores de diferentes orígenes geográficos y periodos temporales, por los que se postuló que la especie *E. coli* consistía en un conjunto de linajes estables, llamados clones, entre los que se producía un bajo nivel de recombinación de los genes cromosómicos (Tenaillon *et al.* 2010). Sin embargo, las primeras secuencias de ADN mostraron sustituciones de bases agrupadas dentro de los genes, siendo interpretadas como eventos de recombinación (Milkman y Crawford, 1983). Además, los árboles filogenéticos reconstruidos a partir de genes individuales habían dado muchas veces resultados incongruentes, no comparables entre sí, indicando la existencia de recombinación a nivel de gen (Dykhuizen y Green, 1991). El análisis del genoma completo ha permitido resolver estas discrepancias, demostrando que la tasa de intercambio genético era 2 veces más alta que la mutación, confirmando así el importante papel de la recombinación en la evolución genómica de *E. coli* (Touchon *et al.* 2009).

Sin embargo, si las secuencias utilizadas para la reconstrucción genética de las cepas son lo suficientemente largas, se puede reconstruir su evolución vertical. Por tanto, se observa una aparente estructura clonal dentro de la especie *E. coli*, a pesar de su elevada tasa de recombinación, con una clara señal filogenética que refleja la relación entre sus cepas (Tenaillon *et al.* 2010).

Excluyendo las regiones con un alto nivel de recombinación, la historia filogenética de las cepas se puede analizar a partir de las secuencias concatenadas de un conjunto de genes conservados (Escobar-Páramo *et al.* 2004b; Wirth *et al.* 2006), que es la base de la MLST (*Multi Locus Sequence Typing*). Utilizando este enfoque, Walk *et al.* (2009) identificaron cepas con un fenotipo bioquímico compatible con *E. coli* pero que estaban genéticamente muy distantes del resto. Estas cepas se clasificaron como clados crípticos de *Escherichia*, divididos en 5 grupos llamados clados I a V, estando el clado I estrechamente relacionado con *E. coli* clásica y *E. fergusonii*, y siendo el clado V el más divergente (Clermont *et al.* 2011). Por otro lado, la *E. coli* clásica quedaría dividida en 7 grupos filogenéticos principales, A, B1, B2, C, D, E, y F. Los grupos C y F están estrechamente relacionados con los grupos B1 y B2, respectivamente. Los grupos B2, D y F se sitúan en la base del árbol, mientras que los grupos A y B1 habrían emergido más recientemente (Moissenet *et al.* 2010; Tenaillon *et al.* 2010; Tourret y Denamur, 2016).

En el año 2000, Clermont y colaboradores desarrollaron un método más sencillo que MLEE para determinar el grupo filogenético, evaluando la presencia o ausencia de los genes *chuA* (presente en los grupos B2 y D) y *yjaA* (presente en el grupo B2, ausente en el D) y el fragmento de ADN TSPE4.C2 (presente en el grupo B1 pero ausente en el grupo A). Sin embargo este método tiene sus limitaciones, puesto que algunas cepas no son clasificadas en ninguno de los grupos propuestos, y existe un margen de error que limita la fiabilidad al 80-85% (Gordon *et al.* 2008). Por ello, en el año 2013, Clermont y colaboradores añadieron un marcador, el gen *arpA*, a los 3 anteriormente citados y diseñaron una PCR para poder asignar los aislados de *E. coli* a los filogrupos de la especie (*E. coli sensu stricto*): A, B1, B2, C, D, E, F y Clado I.

Las cepas comensales se clasifican mayoritariamente dentro de los grupos filogenéticos A y B1. La gran mayoría de las cepas patógenas intestinales pertenecen a los grupos A, B1 y D, mientras que las cepas patógenas extraintestinales pertenecen principalmente a los grupos B2 y D (Chaudhuri y Henderson, 2012).

La herramienta de tipado de MLST también permitió la definición de subgrupos o complejos clonales dentro de los 7 grupos filogenéticos principales. Así por ejemplo, dentro del filogrupo B2 se determinaron 9 subgrupos principales (I a IX) asociados a los complejos de secuencias tipo (STcplx) 131, 73, 127, 141, 144, 12, 14, 452 y 95, definidos según el esquema de MLST de Achtman (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>).

1.4. GRUPOS PATÓGENOS

Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad. Dichos factores de virulencia generalmente difieren entre cepas humanas y animales, que también suelen diferenciarse en sus serotipos. De este modo, las cepas patógenas para seres humanos generalmente no producen infecciones en animales y viceversa. No obstante se ha demostrado que los animales pueden actuar como reservorio de cepas patógenas para el hombre (Aidar-Ugrinovich *et al.* 2007; Sánchez *et al.* 2010a, 2010b; Mora *et al.* 2012a, 2012b; Fernández *et al.* 2013; Pinaka *et al.* 2013; Puño-Sarmiento *et al.* 2013; Irshad *et al.* 2014). Este es el caso, por ejemplo, de los *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) causantes de colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos, que están presentes como comensales en la microbiota intestinal normal del ganado bovino y ovino donde se comportan, en la mayor parte de los casos, como comensales.

La virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial, de manera que las cepas patógenas presentan diferentes tipos de factores de virulencia que suelen ser adquiridos por mecanismos de intercambio genético bacteriano. Entre los factores de virulencia de *E. coli* cabe destacar: la expresión de adhesinas que facilitan la adherencia a las superficies corporales (adhesión); la síntesis de proteínas que confieren a la bacteria la capacidad de invadir diferentes tejidos (invasividad); la producción de toxinas (inducción al daño al hospedador); la síntesis de enzimas que son excretadas al medio con distintas funciones (evasión de las defensas del hospedador); etc.

Están descritos 7 grupos o categorías de *E. coli* diarreagénicos: *E. coli* enteropatógenicos (ECEP) típicos y atípicos, *E. coli* enterotoxigénicos (ECET), *E. coli* enteroinvasivos (ECEI), *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) o enterohemorrágicos (ECEH), *E. coli* enteroagregativos (ECEAgg), *E. coli* con adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* adherente invasivos (ECAI). Las cepas que constituyen estos grupos presentan mecanismos de patogénesis específicos, se corresponden con serotipos distintos y producen infecciones y síndromes diferentes. En la Figura 3 y en la Tabla 1 se representan los mecanismos de patogénesis y se especifican los factores de virulencia de los diferentes grupos de *E. coli* que pueden causar diarrea en seres humanos y se pueden transmitir a través de alimentos y agua.

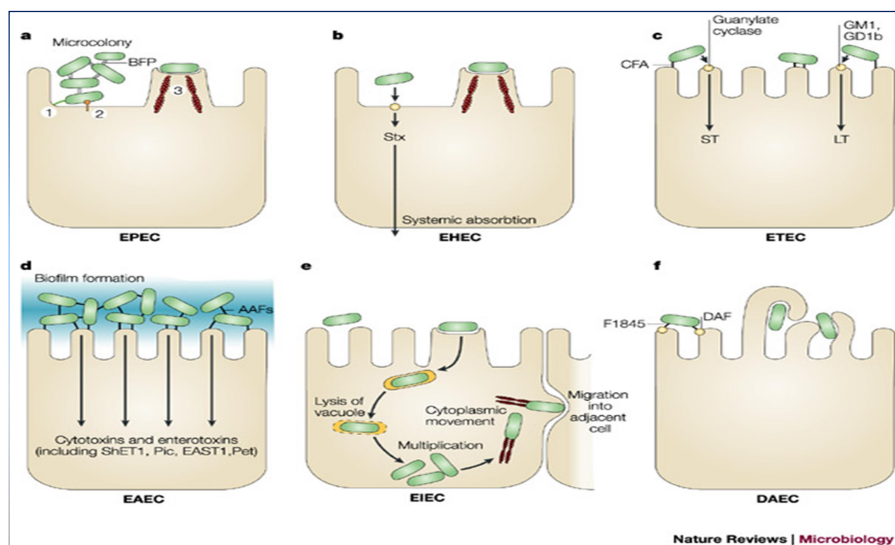


Figura 3. Mecanismos de patogénesis de las 6 categorías principales de *E. coli* diarreagénicos. Fuente: Kaper *et al.* 2004

Tabla 1. Factores de virulencia de *E. coli* diarreagénicos humanos. Adaptada de Blanco *et al.* 2002

<p><i>E. coli</i> enteropatógenicos (ECEP) Adhesina BFP codificada en el plásmido EAF responsable de la adhesión a distancia de la bacteria al enterocito y de la adhesión localizada a células HEp-2. Locus cromosómico LEE con los genes: <i>ea</i>e, <i>tir</i>, <i>esp</i> y <i>sep</i>. Responsable de la adhesión íntima de la bacteria y de la lesión de adhesión y borrado del <i>microvilli</i> intestinal.</p>
<p><i>E. coli</i> enterotoxigénicos (ECET) Factores antigénicos de colonización (CFA/I, II, III y IV). Enterotoxinas: termolábil LT y termoestable STa. Tanto los CFAs como las enterotoxinas se encuentran codificadas en plásmidos.</p>
<p><i>E. coli</i> enteroinvasivos (ECEI) Plásmido de elevado peso molecular (140 MDa) que lleva genes implicados en la invasividad.</p>
<p><i>E. coli</i> verotoxigénicos (ECVT) o enterohemorrágicos (ECEH) Verotoxinas (VT1 y VT2) o <i>Shiga-like toxins</i> (Stx1 y Stx2) codificadas en profagos. Locus cromosómico LEE con genes: <i>ea</i>e, <i>tir</i>, <i>esp</i> y <i>sep</i>. Plásmido de 60 Mda que codifica para una enterohemolisina (E-Hly) y una adhesina fimbrial que puede estar implicada en la colonización intestinal.</p>
<p><i>E. coli</i> enteroagregativos (ECEA o ECEAgg) Adhesión agregativa a células HEp-2 mediada por las fimbrias plasmídicas AAF/I y AAF/II Enterotoxina termoestable EAST1 (plasmídica). Citotoxina de 108 KDa que provoca lesiones destructivas a nivel intestinal.</p>
<p><i>E. coli</i> con adherencia difusa (ECAD) Adhesión difusa a células HEp-2 mediada por la fimbria F1845 Proteína de la membrana externa de 100 Kda denominada AIDA-I.</p>
<p><i>E. coli</i> con adherencia difusa (ECAI) Adhesina FimH localizada en el pili tipo I Fimbria polar larga (LPF: <i>long polar fimbriae</i>) Los determinantes genéticos de este grupo, aunque se relacionan habitualmente con la enfermedad de Crohn, permanecen poco definidos (Nash <i>et al.</i> 2010)</p>

Dentro de los *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) se incluyen los *E. coli* uropatogénicos (UPEC), *E. coli* septicémicos (SEPEC), *E. coli* causantes de la meningitis del recién nacido (NMEC) y *E. coli* patógenos aviarios (APEC). Las cepas pertenecientes a estos grupos patógenos están implicadas en un gran número de infecciones, entre las que destacan las infecciones del tracto urinario y las bacteriemias, tanto en seres humanos como en animales (Gómez, 2017). Los ExPEC forman parte de la microbiota de los hospedadores sanos y, en situaciones fisiológicas normales, colonizan el tracto gastrointestinal de manera asintomática. Sin embargo, ante la combinación de una serie de eventos dependientes tanto del hospedador (compromiso del sistema inmunitario), como de la propia cepa (adquisición de determinados factores de virulencia), pueden colonizar otras localizaciones extraintestinales y provocar infección (Köhler y Dobrindt, 2011; Erjavec y Bertok 2015; Johnson *et al.* 2015; Micenková *et al.* 2016).

Las cepas de los diferentes grupos de *E. coli* diarreagénicos pertenecen a una amplia variedad de serotipos. En la Tabla 2 se relacionan los más frecuentes en humanos.



Tabla 2. Principales serotipos de *E. coli* diarreagénicos humanos. Tomada de Herrera, 2010

ECEP típicos	ECET	ECEI	ECVT	ECEAgg
Clásicos O26:H11,HNM O55:H6,H51,HNM O86:H8,H34,HNM O111:H2,H6,H27,HNM O114:H2,HNM O119:H2,H6,H8,HNM O125 O126:H2 O127:H6,H40,HNM O128:H2 O142:H6,H21, H34	O6:H16,H51,HNM O8:H9,HNM O9:H21 O11:H27 O15:H11,HNM O20:H21,HNM O25:H42,HNM O27:H7,H20,HNM O29:HNM O49:HNM O63:H12,HNM O77:H18,H45 O78:H11,H12, HNM O85:H7 O114:H21,H49, HNM O115:H21,H40, H51 O126:H9 O128:H7,H12,H21, H27,H4,H9 O139:H28 O148:H8,H28 O149:H4,H10 O153:H45 O159:H4,H20,H21, H34,HNM O166:H27 O167:H5 O169:H41,HNM O173:HNM	O28:HNM O29:HNM O73:H18 O112:HNM O115:HNM O121:HNM O124:H7, H30,HNM O135:HNM O136:HNM O143:HNM O144:H25, HNM O152:HNM O153:HNM O159:H2, HNM O164:HNM O167:H4, H5,HNM O171:HNM O173:HNM	O1:H7,HNM O2:H5 O8:H2,HNM O9:H21 O15:HNM O22:H8 O25:HNM O26:H11,HNM O55:HNM O76:H19 O77:H41 O84:H2 O91:H14,H21,HNM O98:HNM O103:H2,H7, H25 O104:H21 O111:H2,H8, HNM O113:H4,H21,H32 O117:H4,H7 O118:H2,H12,H16 O121:H19 O128:H2,HNM O129:HNM O145:H28, HNM O146:H21,H28 O150:HNM O153:H21,H33, HNM O157:H7,HNM O165:H25 O166:H28 O174:HNM ONT:H8,H19,H21, HNM	O3:H2,H3,H21 O4 O7:HNM O9:H10 O15:H1,H18, HNM O17:H18 O21:H21 O25:H9,H18, H19 O44:H18 O51:H11 O77:H18 O78:H2,H10 O85:H10 O86:H2,H11, H18,H21,H27 O92:H33 O104:H? O111:H21 O125:H9,H21 O127:H2 O153:H2 ONT:H10,H21, HNM
Otros O2:H2,H45 O23:H8 O26:HNM O33:H34 O34:H45 O49:H10 O51:H49 O73:H34 O76:H51 O88:H21,H25 O101:H33 O107:HNM O109:HNM O110:H6 O118:H5 O131:H46 O145:HNT O148:H28 O153:H7,H8,H11 O157:H45,HNM O162:H33,HNM O167:H6 OX9:H7 ONT:H7,H45				
En la tabla figuran los diferentes antígenos H asociados a cada antígeno O. Así, por ejemplo "O26:H11,HNM" son realmente 2 serotipos (O26:H11 y O26:HNM). HNM:H no móvil.				

A continuación, la introducción se centra en los 2 grandes grupos de *E. coli* diarreagénicos objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

1.5. E. COLI ENTEROPATOGÉNICOS (ECEP)

Los ECEP constituyen el primer grupo patógeno descrito de *E. coli* (Kaper *et al.* 2004; Vidal *et al.* 2007). La infección por cepas de ECEP es una de las causas más comunes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo (Bray 1945; Cravioto *et al.* 1988; Nataro y Kaper, 1998; Scaletsky *et al.* 2002; Vidal *et al.* 2007; Abe *et al.* 2009), y se han descrito como predominantes los serotipos O111:H2 y O119:H6. Una de las principales características de la infección es la diarrea de tipo acuoso, que puede ocurrir en diversos grados de intensidad y suele afectar principalmente a niños menores de 6 meses y a los de 2 años (Robins-Browne y Hartland, 2002). Las cifras de letalidad en países subdesarrollados son elevadas situándose entre el 20% y el 50% (Vidal *et al.* 2007). Además, se ha notificado que en algunos países latinoamericanos las infecciones por ECEP superan a las provocadas por *Campylobacter* spp. y rotavirus en la población infantil (Nataro y Kaper, 1998; Winfield *et al.* 2003).

Las funciones de diversos factores de virulencia y los mecanismos de patogénesis de los ECEP han sido ampliamente estudiados (Nataro y Kaper, 1998; Dean y Kenny, 2009). Los ECEP inducen una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión de “adherencia o borrado” o lesión A/E (*attaching and effacing*) (Kaper *et al.* 1998). La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito (Celli *et al.* 2000; Goosney *et al.* 2000) formándose unas estructuras en forma de “pedestal”. El modelo de patogénesis de ECEP descrito por Donnenberg y Kaper en 1992 se divide en 3 fases: a) adherencia inicial, b) inyección de factores y transducción de señales, e c) íntima adherencia.

La capacidad de inducir esta lesión (A/E) está codificada por genes que se encuentran en una isla de patogenicidad de 35 kb denominada LEE (*Locus of enterocyte effacement*). Esta LEE también se ha descrito en otros microorganismos patógenos humanos y animales como son los ECVT y también en *Citrobacter rodentium*, que induce hiperplasia colónica en ratones (Kaper *et al.* 2004).

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

En 1995, los ECEP fueron divididos en 2 grupos: ECEP típicos (ECEPt) y ECEP atípicos (ECEPa). La diferencia básica entre ambos es la presencia del pEAF en ECEPt y su ausencia en ECEPa (Kaper, 1996; Nataro y Kaper, 1998; Schmidt 2010). Trabulsi y colaboradores (2002)

describieron otras muchas diferencias entre ambos grupos. De hecho, aunque la mayoría de los estudios han identificado los serogrupos clásicos entre los ECEPa, en los últimos años se han descrito muchas cepas ECEPa pertenecientes a una amplia variedad de serogrupos (Blanco *et al.* 2006a, 2006b; Hernandez *et al.* 2009). En cuanto al genotipo, las cepas de ECEPa presentan con mayor frecuencia genes de virulencia de otros patotipos diarregénicos en relación con los ECEPT (Vieira *et al.* 2001; Trabulsi *et al.* 2002; Beutin *et al.* 2005a; Scaletsky *et al.* 2009; Horcajo *et al.* 2012), lo que da una idea de su heterogeneidad. Gomes y colaboradores (2004) demostraron que las cepas ECEPa pertenecientes a serogrupos no clásicos presentan incluso más diversidad. Estudios epidemiológicos y experimentales apoyan la hipótesis de que al menos algunos ECEPa podrían proceder de ECVT que han perdido los genes que codifican para verotoxinas (*vt*) (Afset *et al.* 2008; Scaletsky *et al.* 2009; Horcajo *et al.* 2012).

En los últimos 10 años, los estudios epidemiológicos de ECEPT y ECEPa han mostrado una prevalencia mucho mayor de ECEPa tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, y los ECEPa han emergido como un patógeno importante (Hu y Torres, 2015).

Hay pocos estudios sobre la patogenicidad de los ECEPa. Se podría pensar que las cepas de ECEPa son menos virulentas que las típicas por la falta del plásmido pEAF. Levine y colaboradores (1985) demostraron que una cepa O127:H6 pEAF negativa era menos virulenta para adultos voluntarios que una cepa salvaje. Sin embargo, todavía no se ha demostrado que los ECEPa sean menos virulentos, ya que estos microorganismos pueden portar otros factores de virulencia. Se han descrito varios casos de infecciones en los que están implicadas cepas de ECEPa, como el de un brote de diarrea causado por el serotipo O111:H9 en Finlandia (Viljanen *et al.* 1990). En el año 2004 Robins-Browne y colaboradores realizaron un estudio donde se analizaron un total de 1.185 muestras de heces en Melbourne, 696 de pacientes con gastroenteritis y 489 de pacientes asintomáticos, y observaron que las cepas de ECEPa eran las que se aislaban con mayor frecuencia por encima de otras bacterias, virus y parásitos típicos de gastroenteritis, y vieron que los ECEPa eran más comunes en pacientes con gastroenteritis (12,8%) que en pacientes asintomáticos (2,3%). También en Melbourne, en otro estudio (Nguyen *et al.* 2006), se intentó determinar si los ECEPa eran patógenos, comparando las características clínicas de pacientes infectados con ECEPa con las de niños infectados por otros agentes causantes de diarrea, y llegaron a la conclusión de que los pacientes infectados por ECEPa presentaban diarreas leves, sin deshidratación, sin inflamación, no necesariamente con fiebre, vómitos, o dolor abdominal. Sin embargo, constataron que la duración de la diarrea de los pacientes infectados con ECEPa era significativamente más prolongada que la causada por otras especies o en las que no se había identificado ningún patógeno. Por este motivo la infección con ECEPa se asocia con diarreas prolongadas.

Además, y al contrario de lo que está ocurriendo con los ECEPT, los ECEPa son un grupo emergente, ya que la frecuencia con la que se aíslan estas cepas ha aumentado en los últimos

años. Este hecho se pone de manifiesto en un estudio que realizó nuestro grupo entre 1996-1999, en colaboración con la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti de Lugo (HULA), en el que se examinó la prevalencia de los diferentes tipos de *E. coli* diarregénicos en coprocultivos de pacientes con diarrea y otras alteraciones gastrointestinales. En dicho estudio los ECEPT únicamente se aislaron en 5 de los 2.015 pacientes estudiados (0,2%), mientras que los ECEPa se identificaron en 105 (5,2%) (Blanco *et al.* 2006a). Al analizar el período 2005-2013 se detectó un incremento significativo de las infecciones causadas por los ECEP, con un 0,6% de prevalencia de los ECEPT y de un 11,5% para los ECEPa. Estos datos corroborarían la hipótesis de los ECEPa como grupo emergente (López *et al.* 2007; datos LREC, no publicados).

La mayoría de las cepas de ECEP de origen animal carecen del gen *bfpA* y por lo tanto son ECEPa, convirtiéndose los animales portadores de este tipo de cepas en reservorio potencial para el hombre (Cid *et al.* 2001; Aktan *et al.* 2004; Blanco *et al.* 2005; Cortés *et al.* 2005; Krause *et al.* 2005; Malik *et al.* 2006; Aidar-Ugrinovich *et al.* 2007; Vu-Khac *et al.* 2007).

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

Los ECEP aislados en perros pertenecen a varios serogrupos, entre ellos el O45, O49, O115, O118 y O119 (Beutin, 1999). Dentro de los serotipos asociados con enfermedades en el destete de los conejos están el O20:H7, O26:H11, O109:H7, O128:H2, O132:H2 y O153:H7 (Blanco *et al.* 1997c; Milon *et al.* 1999).

Moura y colaboradores (2009) publicaron un estudio donde compararon cepas ECEPa aisladas de pacientes con cepas de aisladas de animales (gatos, perros, conejos, bovino, ovino y monos) y llegaron a la conclusión de que los perfiles de factores de virulencia de las cepas de ambos orígenes eran similares. Las cepas se analizaron mediante las técnicas de MLST y PFGE, y con ambas técnicas fue posible demostrar que las cepas aisladas de humanos y animales compartían un origen clonal. En estudios similares se llega a la misma conclusión, confirmando también la presencia de ECEPa potencialmente patógenos en gatos domésticos, en perros (Goffaux *et al.* 2000; Nakazato *et al.* 2004; Morato *et al.* 2008), en aves de corral (Krause *et al.* 2005; Farroq *et al.* 2009) y en aves salvajes (Kobayashi *et al.* 2008).

1.6. *E. COLI* VEROTOXIGÉNICOS (ECVT)

Dentro de las categorías de *E. coli* diarreagénicos destacan por su enorme importancia como patógenos emergentes que causan brotes y graves infecciones en seres humanos, tales como la colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH), los *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) (Blanco *et al.* 1993b; Beutin *et al.* 2004; Blanco JE *et al.* 2004; Gyles, 2007; Kaspar *et al.* 2009; Pennington, 2010; Sánchez *et al.* 2010d; Loirat, 2013; Page y Liles, 2013; Taylor *et al.* 2013; Trees *et al.* 2014; Lambert *et al.* 2015).

Con esta denominación (ECVT) se conocen todas aquellas cepas de *E. coli* capaces de producir alguno de los 2 tipos de citotoxina conocidas como verotoxinas (VT) o toxinas shiga (Stx).

Además de CH y SUH, los ECVT pueden provocar en seres humanos dolencias como diarrea no sanguinolenta, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) e incluso infecciones asintomáticas (Sánchez *et al.* 2010d). Normalmente este tipo de infecciones comienza con 1 a 3 días de diarrea no sanguinolenta, que a continuación pasa a ser una CH en el 90% de los casos aproximadamente. Entre el 30% y el 60% de los casos cursa con vómitos, y se detecta fiebre, aunque escasa, en menos del 30% de los pacientes (Mead y Griffin, 1998). Después de 7 días aparecen las complicaciones (SUH o PTT) en aproximadamente el 15% de los casos y el resto evoluciona hacia una resolución espontánea del proceso (Tarr *et al.* 2005). La tasa de mortalidad del SUH oscila entre un 5% y un 10% (Karmali, 1989; Blanco *et al.* 1993, 1995; Tarr *et al.* 2005; Karch *et al.* 2006). La eliminación del microorganismo, una vez resuelto el proceso, por parte de los individuos asintomáticos puede contribuir a una diseminación de la infección al colectivo, mediante la transmisión de persona a persona, si bien el período de mayor riesgo de transmisión probablemente sea la fase de diarrea aguda (Tarr *et al.* 2005).

En 1987 Levine propuso incluir determinados ECVT, aquellos que presentan características clínico-patológicas coincidentes con las del serotipo O157:H7, dentro de la categoría de los *E. coli* enterohemorrágicos (ECEH). Este concepto es importante ya que en el fondo se basa en la creencia de que solo determinados ECVT serían realmente patógenos para seres humanos. En este sentido, Mellmann *et al.* (2008a) han denominado a las cepas capaces de producir SUH como ECSUH (*E. coli* asociadas a SUH).

Los ECVT causantes de infecciones en seres humanos pertenecen a un amplísimo abanico de serotipos (Tabla 3). Ciertos serotipos de ECVT, tales como O26, O103, O111, O145 y O157, están altamente asociados con casos de CH y SUH, principalmente en países anglosajones y Japón (Griffin y Tauxe, 1991; Nataro y Kaper, 1998; Caprioli *et al.* 2005), y fueron, por tanto, clasificados como ECEH (Levine 1987; Tzipori *et al.* 1988). La mayoría de los casos de CH y SHU se han atribuido a cepas de ECEH del serotipo altamente virulento O157:H7, conocido popularmente como el bacilo O157 o la bacteria de las hamburguesas

(Riley *et al.* 1983; Carter *et al.* 1987; Karmali 1989; Kleanthous *et al.* 1990; Griffin y Tauxe, 1991; Blanco *et al.* 1993a,b, 1994, 1995, 2001, 2002; Armstrong *et al.* 1996; Prats *et al.* 1996; Pièrard *et al.* 1997a; Kaper y O'Brien, 1998; Keskimäki *et al.* 1998; Paton y Paton 1998a; Reilly 1998; Karch *et al.* 1999a; Pebody *et al.* 1999; Banatvala *et al.* 2001; Schmidt *et al.* 2001; Mora 2002, 2005; Rangel *et al.* 2005; Garrido *et al.* 2006), si bien cada vez se registran con mayor frecuencia casos de infección ocasionados por cepas de ECVT pertenecientes a serogrupos distintos del O157, como O26, O103, O111, y O145, entre otros (Nataro y Kaper, 1998; Jelacic *et al.* 2003; Tozzi *et al.* 2003; Brooks *et al.* 2005; Karch *et al.* 2005; Nielsen *et al.* 2006; Rivas *et al.* 2006a; Werber *et al.* 2008b; Rúgeles *et al.* 2010; Coombes *et al.* 2011; Marejková *et al.* 2013; Taylor *et al.* 2013). Cabe destacar el O26:H11, considerado el segundo ECVT de mayor importancia por detrás del O157:H7, y que provocó en la UE el 18,6% de los casos de infección por este tipo de bacterias en el periodo 2007-2010 (EFSA/ECDC, 2012). Por todo esto, se suele clasificar a los ECVT en O157 y no O157.

Tabla 3. Serotipos O:H de ECVT de origen humano. Adaptada de López, 2004

PRINCIPALES SEROTIPOS ECVT DE ORIGEN HUMANO		
O1:H1,H2,H7,H20,HNM	O71:HNM	O123:H19,H49,HNM
O2:H1,H2,H5,H6,H7,H11,H27,H29,H44,HNM	O73:H34	O124:HNM
O3:H10	O74	O125:H8,HNM,H?
O4:H5,HH10,H40,HNM	O75:H1,H5,H8,HNM	O126:H2,H8,H11,H20,H21,H27,HNM
O5:H16,HNM	O76:H7,H19	O127
O6:H1,H2,H4,H12,H28,H29,H31,H34,H49,HNM	O77:H4,H7,H18,H41,HNM	O128:H2,H7,H8,H10,H12,H25,H31,H45,HNM
O7:H4,H6,H8,HNM	O78:HNM	O129:HNM
O8:H2,H9,H11,H14,H19,H21,H25,HNM	O79:H7,H14	O130:H11
O9:H7,H21,HNM	O80:HNM	O131:H4
O11:H2,H8,H49,HNM	O81:HNM,H?	O132:HNM
O12:HNM	O82:H5,H8,HNM	O133:H53,HNM
O14:HNM	O83:H1,HNM	O134:H25
O15:H2,H8,H27,HNM	O84:H2,HNM	O137:H6,H41
O16:H6,H21,HNM	O85:H10,H23,HNM	O138:H2
O17:H18,H41	O86:H10,H40,HNM	O141:H2,H8,HNM
O18:H7,H12,H15,HNM,H?	O87:H16	O142
O20:H7,H19,HNM	O88:H25,HNM	O143:HNM
O21:H5,H?	O89:HNM	O144:HNM

PRINCIPALES SEROTIPOS ECVT DE ORIGEN HUMANO		
O22:H1,H5,H8,H16,H21,H40, HNM	O90:HNM	O145:H4,H8,H16,H25, H26,H28,HNM
O23:H7,H16	O91:H4,H10,H14,H15,H21, H40,HNM	O146:H5,H8,H14,H21, H28,HNM
O25:H2,H14,HNM	O92:H3,H11	O148:H28
O26:H2,H8,H11,H12,H21,H32, HNM	O93:H19	O150:H8,H10,HNM
O27:H30,HNM	O95:HNM	O152:H4
O28:H25,H35,HNM	O96:H19	O153:H2,H11,H12,H21, H25,H30,H33,HNM
O30:H2,H21,H23	O98:H8,HNM	O154:H4,H19,H20,HNM
O32:H45	O100:H25,H32	O156:H4,H7,H25,H27, HNM
O37:H41	O101:H9,HNM	O157:H7,HNM
O38:H21	O102:H6,H7	O159:H9,H12
O39:H4,H8,H28	O103:H2,H4,H6,H7,H11, H18,H21,H25,HNM	O160:H?
O40:H2,H8	O104:H2,H7,H16,H21,HNM	O161:HNM
O41:H2	O105:H18,H19,H20	O162:H4
O43:H2	O106	O163:H19,H25,HNM
O44	O107:H27	O165:H10,H19,H21,H25, HNM
O45:H2,H7,HNM	O109:H2	O166:H12,H15,H28
O46:H2,H31	O110:H16,H19,H28,HNM	O168:HNM
O48:H21	O111:H2,H7,H8,H11, H21,H30,H34, H40,H49,HNM,H?	O169:HNM
O49:H10,HNM	O112:H2,H19,H21	O171:H2,HNM
O50:H7,HNM	O113:H2,H4,H5,H7,H21,H32, H53,HNM	O172:HNM,H?
O52:H19,H23,H25	O114:H4,H48,H?	O173:H2
O55:H6,H7,H9,H10,H19,HNM, H?	O115:H10,H18	O174(OX3):H2,H8,H21, HNM
O60:HNM	O116:H4,H19,H21,HNM	O175(OX7):H16
O64:H25	O117:H4,H7,H19,H28, HNM	OX177:HNM
O65:H16	O118:H2,H12,H16,H30,HNM	OX178:H7
O68:HNM	O119:H5,H6,H25,HNM	OX179:H8
O69:H11,HNM	O120:H19	OxX181:H49
O70:H11	O121:H8,H11,H19,HNM	
En negrilla aparecen los serotipos asociados con el SUH		

Por otro lado, Karmali y colaboradores propusieron en el año 2003 clasificar los ECVT en 5 seropatotipos (del A al E), según su asociación con casos de SUH y brotes. Posteriormente, en el año 2011, debido al brote provocado por el seropatotipo híbrido O104:H4 en Alemania, se añadió una categoría especial a esta clasificación (Mora *et al.* 2011), ya que hasta la fecha ninguna cepa de ECVT había causado tantos casos de SUH (845 casos solo en Alemania) (AESAN, 2012). Finalmente, debido a su incidencia, se amplió el número de serotipos incluidos originalmente por Karmali (Tabla 4) (Brooks *et al.* 2005; EFSA, 2009, 2013; Bosilevac y Koohmaraie, 2011, 2012; Delanoy *et al.* 2012; Kobayashi *et al.* 2013).

Tabla 4. Clasificación ECVT en seropatotipos y su relación con la virulencia.
Fuente: Herrera, 2015

ECVT	CARACTERÍSTICAS	SEROTIPOS
Categoría especial Cepas altamente virulentas asociadas con tasas elevadas de mortalidad.	Cepas enteroagregativas productoras de la toxina VT2a pertenecientes al serotipo O104:H4. Una cepa de esta categoría causó un gran brote de Alemania en el año 2011 que provocó numerosos casos de SUH, CH y muertes.	O104:H4
Seropatotipo A Cepas altamente virulentas	O157:H7 (no fermentadoras de sorbitol) y O157:HNM (HNM=no móviles; fermentadoras de sorbitol) causantes de numerosos brotes y frecuentemente asociadas con casos esporádicos de SUH y CH. Las cepas poseen el gen <i>eae</i> .	O157:H7, O157HNM
Seropatotipo B Cepas altamente virulentas	Incluye serotipos que han causado brotes ocasionales y son relativamente comunes en casos esporádicos de SUH y CH. Las cepas poseen el gen <i>eae</i> .	O26:H11/HNM, O45:H2/HNM, O103:H2, H11, H25/HNM, O111:H8/HNM, O121:H7, H19/HNM, O145:H28/HNM
Seropatotipo C Cepas con riesgo potencial elevado	El seropatotipo C incluye serotipos no responsables de brotes pero que se han aislado de casos esporádicos de SUH y CH. Se incluyen únicamente los serotipos considerados de mayor riesgo y prevalencia.	O1:H42, O5:HNM, O7:H6, O76:H19, O80:H2, O86:H27, O91:H10/H21, O104:H21, O105:H18, O113:H21, O121:H2/HNM, O123:H2, O128:H2, O165:H25, O174:H2/H21.
Seropatotipo D Cepas de riesgo moderado	El seropatotipo D incluye serotipos no responsables de brotes y que nunca se han asociado con SUH, pero que sí se han aislado de pacientes con patologías menos graves (diarrea sin síntomas severos). Se especifican únicamente los serotipos considerados de mayor riesgo y prevalencia.	O7:H4, O69:H11, O103:H25, O113:H4, O117:H7, O119:H25, O132:HNM, O146:H21, O171:H2, O172:H, O174:H8
Seropatotipo E Cepas de bajo riesgo	Incluye una larga lista de serotipos aislados de animales, alimentos y del medioambiente no implicados nunca con casos clínicos/enfermedad en humanos.	Muchos serotipos

Los ECVT también pueden producir infecciones en animales. En animales domésticos las colibacilosis son muy frecuentes, afectando principalmente a animales de pocos días de edad y recién destetados, ocasionando importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado bovino, porcino y ovino (Mora, 2002; Kaper *et al.* 2004; Aidar-Ugrinovich *et al.* 2007). Los ECVT están además implicados en la enfermedad de los edemas en ganado porcino (Oanh *et al.* 2010).

1.6.1. Factores de virulencia

Actualmente se conocen casi un centenar de genes que pueden influir en la virulencia de los ECVT (Karch *et al.* 1998, 1999b; Dobrindt *et al.* 2003). En la Tabla 5 figuran los genes y marcadores de virulencia más importantes.

Tabla 5. Principales genes y factores de virulencia de ECVT

Factores de virulencia	Principales genes	Localización de los genes	Referencia
VT (verotoxinas)	<i>vt1</i> y/o <i>vt2</i>	Profagos	Konowalchuk <i>et al.</i> 1977; Feng <i>et al.</i> 2011b; Scheutz <i>et al.</i> 2012
pO157	<i>ehlyA</i> , <i>katP</i> , <i>etp</i> , <i>stcE</i> , etc.	Plásmido	Burland <i>et al.</i> 1998; Makino <i>et al.</i> 1998; Lim <i>et al.</i> 2010a
LEE (isla de patogenicidad): genes <i>eae</i> , <i>tir</i> , <i>espA</i> , <i>espD</i>	<i>eae</i> , <i>tir</i> , <i>espA</i> , <i>espD</i>	Cromosoma	Jerse <i>et al.</i> 1990; Jerse y Kaper, 1991; Kaper <i>et al.</i> 1998, 1999; Paton <i>et al.</i> 1998; McNally <i>et al.</i> 2001
E-hlyA (enterohemolisina)	<i>E-hlyA</i>	Plásmido	Schmidt <i>et al.</i> 1995
Saa (adhesina autoaglutinante)	<i>saa</i>	Plásmido	Paton <i>et al.</i> 2001; Toma <i>et al.</i> 2008
SubAB (subtilasa)	<i>subAB₁</i>	Plásmido	Paton <i>et al.</i> 2004
	<i>subAB₂₋₁</i>	Cromosoma	Tozzoli <i>et al.</i> (2010)
	<i>subAB₂₋₂</i>	Cromosoma	Funk <i>et al.</i> (2013)
	<i>subAB₂₋₃</i>	Cromosoma	Nüesch-Inderbinnen <i>et al.</i> 2015; Tasara <i>et al.</i> 2017
EspP (serina proteasa)	<i>espP</i>	Plásmido	Brunder <i>et al.</i> 1997; Orth <i>et al.</i> 2010; Xicohtencatl-Cortes <i>et al.</i> 2010
KatP (catalasa peroxidasa)	<i>katP</i>	Plásmido	Brunder <i>et al.</i> 1996; Lim <i>et al.</i> 2010a
StcE (metaloproteasa)	<i>stcE</i>	Plásmido	Grys <i>et al.</i> 2005, 2006; Kobayashi <i>et al.</i> 2013

1.6.1.1. Verotoxinas (VT1 y VT2)

Se considera que el principal factor de virulencia de los ECVT es la producción de toxinas *Shiga* (Stx), también conocidas como verotoxinas (VT) (Kaper *et al.* 2004; Gyles, 2007). Las verotoxinas son potentes citotoxinas que destruyen las células Vero y están relacionadas estructural e inmunológicamente con la toxina *Shiga* producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Konowalchuk *et al.* 1977; Blanco *et al.* 1983; O'Brien y Holmes, 1987; Takeda *et al.* 1993; Scotland y Smith, 1997).

Las verotoxinas se encuentran codificadas en el genoma de profagos integrados en el cromosoma bacteriano (Jackson *et al.* 1987; Willshaw *et al.* 1987; Strobine *et al.* 1988; O'Brien *et al.* 1989; Muniesa y Jofre, 1998; Unkmeir y Schmidt, 2000; Koch *et al.* 2001; Schmidt 2001; Muinesa *et al.* 2003, 2004; Allison, 2007) y están constituidas por una subunidad enzimática A de aproximadamente 33.000 d, en la que radica la actividad enzimática, y 5 o 6 subunidades B que tienen un peso molecular de unos 7.500 d y cuyo papel es fijar la toxina a receptores celulares compuestos por glicolípidos (Gb3 o Gb4). Estas toxinas inhiben la síntesis proteica al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 60S. En cuanto a la patogénesis, las verotoxinas son liberadas en el intestino, pasan a la sangre y causan daños en el epitelio vascular. Inducen una coagulación intravascular local y una acumulación de fibrina en el sistema nervioso central, en el tubo digestivo y en los riñones. Estos eventos pueden conducir a un daño intestinal, renal, cerebral o multisistémico (Karmali, 1989).

Existen 2 tipos de verotoxinas, VT1 y VT2, y varias variantes de VT1 (VT1a, VT1c y VT1d) y VT2 (VT2a, VT2b, VT2c, VT2d, VT2e, VT2f, VT2g) (Feng *et al.* 2011b; Scheutz *et al.* 2012) (Tabla 6).

Tabla 6. Nomenclatura de las verotoxinas. Adaptada de López, 2006

Tipo	Subtipo	Otras denominaciones (variedades incluidas)	Asociaciones más frecuentes	Referencias
VT1	VT1a	Stx1a	Humanos, bovino y ovino	Zweifel <i>et al.</i> 2013; Shridhar <i>et al.</i> 2017
	VT1c	Stx1c = Stx1ox3	Humanos y ovino	Brett <i>et al.</i> 2003; Beutin <i>et al.</i> 2004; Lienemann <i>et al.</i> 2012
	VT1d	Stx1d	Bovino, carne, ciervo y jabalí	Bürk <i>et al.</i> 2003; Martin y Beutin, 2011
VT2	VT2a	Stx2a	Humanos	Friedrich <i>et al.</i> 2002
	VT2b	Stx2b	Humanos y ciervos	Eggert <i>et al.</i> 2012
	VT2c	Stx2c (Stx2c, Stx2d-ount, Stx2d-ox3a)	Humanos y bovino	Friedrich <i>et al.</i> 2002
	VT2d	Stx2d (Stx2-vha, Stx2-vhb)	Ovino	Friedrich <i>et al.</i> 2002
	VT2e	Stx2e (Stx2e, Stx2ev)	Porcino	Oanh <i>et al.</i> 2010
	VT2f	Stx2f	Palomas	Schmidt <i>et al.</i> 2000
	VT2g	Stx2g	Ovino	Stephan <i>et al.</i> 2008

La toxina VT2 es la más potente, siendo los subtipos VT2a y, en menor medida, VT2c y VT2d los comúnmente asociados a SUH (Friedrich *et al.* 2002; Feng *et al.* 2011b). En contraste, VT2b (Stritt *et al.* 2013), VT2e (Friedrich *et al.*, 2002), VT2f (Skinner *et al.* 2013), y VT2g (Prager *et al.* 2011) raramente se han asociado a enfermedades graves en humanos. La verotoxina VT2b se describió en cepas ECVT aisladas de ciervos, ganado ovino y caprino (Martin y Beutin 2011), y la VT2g en productos de origen bovino (Stephan *et al.* 2008). Por otro lado, VT2e está asociada a las cepas de *E. coli* verotoxigénicas causantes de la enfermedad de los edemas en cerdos (Oanh *et al.* 2012), mientras que VT2f es la más frecuentemente encontrada en cepas ECVT aisladas de pájaros, fundamentalmente palomas (Schmidt *et al.* 2000).

En cuanto a VT1, VT1a se ha asociado a SUH, a diarrea sanguinolenta y a diarrea (Zweifel, *et al.* 2013). VT1c se ha relacionado principalmente a diarrea sin complicaciones o con portadores asintomáticos (Friedrich *et al.* 2002, 2003; Beutin *et al.* 2004), aunque también se describió en algún caso de SUH (Lienemann *et al.* 2012). Mientras que VT1d se ha asociado principalmente a ganado bovino y a carne de ciervo y jabalí (Bürk *et al.* 2003; Martin y Beutin, 2011).

1.6.1.2. Otros factores de virulencia

Los ECVT, además de producir verotoxinas, presentan factores de virulencia adicionales que incrementan su poder patógeno y que están principalmente codificados en profagos, islas de patogenicidad o plásmidos (Tabla 5) (Torres *et al.* 2002, 2005a,b; Jordan *et al.* 2004; Kaper *et al.* 2004; Karmali, 2004; Toma *et al.* 2004; Mainil y Daube, 2005; Prager *et al.* 2005, Scaletsky *et al.* 2005; Shen *et al.* 2005; Garrido *et al.* 2006; Hedican *et al.* 2009).

Los ECVT se unen al epitelio del intestino grueso a través de diferentes tipos de adhesinas codificadas en el plásmido CDV419 (pO157) (plásmidos similares en otros serotipos) o de la intimina codificada en la isla de patogenicidad LEE, y posteriormente barren el microvilli intestinal. Aunque los ECVT se unen íntimamente a los enterocitos, no llegan a invadirlos intracelularmente. El 100% de las cepas de ECVT O157 poseen el gene *eae* y el plásmido pO157 (CVD419), frente a menos del 30% de los ECVT no O157. El gen *eae* se ha asociado claramente con la virulencia, y se detecta en la mayoría (> 90%) de las cepas causantes del SUH (Blanco *et al.* 2004; Beutin *et al.* 2004, Karmali, 2004). No obstante, aunque el gen *eae* se considera que es un importante factor de virulencia de los ECVT, su presencia no es esencial para la patogenicidad e incluso cepas *eae* negativas pueden provocar patologías muy graves, como es el caso de los brotes de SUH en EE.UU. y Australia causados por cepas de ECVT O104:H21 y O113:H21 *eae* negativas, respectivamente (Paton *et al.* 1999).

Plásmido pO157

El pO157 es un plásmido con un tamaño de 92 a 104 kb (Burland *et al.* 1998; Makino *et al.* 1998; Lim *et al.* 2010a). Otros plásmidos similares a pO157 con un tamaño entre 70 y 200 kb también se encontraron en la mayoría de los ECVT aislados de seres humanos y animales (Nataro y Kaper, 1998). Todos estos plásmidos son portadores de genes como la hemolisina y los genes que influyen en la adhesión bacteriana. Hay autores que sugieren la existencia de una correlación entre estos grandes plásmidos y el paso de diarrea a SUH (Caprioli *et al.* 2005).

El pO157 muestra una estructura dinámica e incluye diferentes elementos genéticos móviles como transposones, profagos, secuencias de inserción y partes de otros plásmidos. La secuencia completa de pO157 revela 100 regiones codificantes de proteínas (ORFs) (Burland *et al.* 1998). Entre ellas, solo 43 ORFs mostraron suficientes similitudes con proteínas conocidas.

Dentro del pO157 se caracterizaron diferentes genes, incluyendo una hemolisina (*E-hlyA*) (Schmidt *et al.* 1995), una catalasa-peroxidasa (*katP*) (Brunner *et al.* 1996), un aparato de sistema de secreción de tipo II (*etp*) (Schmidt *et al.* 1997), una serina proteasa (*espP*) (Brunner *et al.* 1997), una adhesina putativa (*toxB*) (Tatsuno *et al.* 2001), una metaloproteasa de zinc (*stcE*) (Lathem *et al.* 2002) y un fragmento de *eae* conservado (*ecf*) (Yoon *et al.* 2005). A pesar de que varios estudios muestran que los genes codificados en el pO157 contribuyen a la adhesión bacteriana en el cultivo celular, la supervivencia *in vitro*, la colonización y persistencia en el ganado (Tatsuno *et al.* 2001; Lim *et al.* 2007), la importancia biológica de pO157 no está plenamente demostrada (Lim *et al.* 2010a, 2010b).

Isla de patogenicidad LEE

Aunque el gen *eae*, que codifica para la intimina, es el principal gen implicado en la lesión intestinal de adhesión y barrido (*attaching and effacing*), existen otros genes que también están implicados y que se agrupan en una isla de patogenicidad conocida como “*Locus of Enterocyte Effacement*” (LEE) (Jerse *et al.* 1990; Jerse y Kaper, 1991; Kaper *et al.* 1998, 1999; Paton *et al.* 1998; McNally *et al.* 2001).

La isla LEE de la cepa EDL933 del serotipo O157:H7, secuenciada completamente, muestra un tamaño de 43.359 pb y un total de 41 genes (Perna *et al.* 1998). Presenta un contenido en G+C (39,59%) mucho menor que el del resto del cromosoma bacteriano y tiene en sus extremos secuencias repetitivas, lo que refleja una transferencia genética horizontal. El gen *eae* codifica para la intimina (proteína de Eae de 94 a 97 KDa de la membrana externa de la pared celular) que actúa como adhesina fijando íntimamente la bacteria al enterocito (Kaper *et al.* 2004). La bacteria también produce los receptores Tir (*Translocated intimin*

receptor) a los que se une la intimina. Los receptores Tir son translocados por el sistema de secreción tipo III (complejo oligomérico a modo de anillo con un poro central de unos 20 nm) y en el enterocito son fosforilados y se insertan en la membrana. Las proteínas EspA, EspB y EspD (*E. coli secreted proteins*) también son secretadas por el sistema tipo III y aunque su función concreta se desconoce, la secreción de las mismas es esencial para la formación de la lesión de adhesión y borrado.

La diferenciación de los alelos que codifican para los distintos tipos de intiminas es importante para el diagnóstico, la epidemiología y el establecimiento de las relaciones clonales de los ECVT y los ECEP, así como para los estudios inmunológicos y el desarrollo de vacunas. El gen *eae* presenta una región C-terminal (3') altamente variable de 280 aminoácidos que codifica para la parte de la proteína que interacciona directamente con el receptor tir. Por el contrario, la región N-terminal es muy conservada. Ello favorece enormemente los estudios de detección y caracterización del gen *eae*: por una parte es posible establecer unos cebadores basados en la región variable del gen que sirvan para diferenciar las diferentes variedades, pero también es posible el diseño de cebadores basados en la región conservada, para la detección conjunta de todas ellas. Gannon *et al.* (1993) diferenciaron 5 variedades del gen *eae* al analizar los fragmentos generados al digerir con enzimas de restricción el ADN amplificado por cebadores específicos de la región conservada del gen *eae* de diferentes cepas de ECVT y ECEP. Posteriormente, Adu-Bobie *et al.* (1998) describieron 4 variedades de intiminas diferenciables mediante PCR: α , β , γ , δ . Oswald *et al.* (2000) identificaron la intimina tipo ϵ en un ECVT del serotipo O103:H2, y establecieron la existencia de los subtipos $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 1$ y $\gamma 2$. Tarr y Whittam (2002), trabajando con cepas humanas de los serotipos O111:H8 y O111:H9, comprobaron que las cepas del serotipo O111:H8 presentaban la intimina θ , mientras que las cepas del serotipo O111:H19 poseían la nueva intimina ζ . La intimina ζ también se determinó en cepas de ECVT O84:HNM de origen bovino por Jores *et al.* (2003) y en ECVT del serotipo O156:HNM de origen ovino por Blanco *et al.* (2003b). Zhang *et al.* (2002b) determinaron la secuencia nucleotídica de 3 nuevas variedades del gen *eae*: κ , η , ι . Posteriormente, en el LREC, Blanco y colaboradores (2004a, b, c), tras descubrir otras 4 nuevas variantes ($\beta 2$, μ , ν , ξ), desarrollaron un sistema de tipado por PCR que permite detectar y diferenciar 15 tipos y subtipos de intiminas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, δ/κ , ϵ , ζ , η , ι , λ , μ , ν , ξ . A día de hoy, se han descrito 34 tipos y subtipos de intiminas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ , $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, $\epsilon 5$, $\zeta 1$, $\zeta 2$, $\zeta 3$, ν , $\eta 1$, $\eta 2$, $\theta 1$, $\theta 2$, $\iota 1A$, $\iota 1B$, $\iota 1C$, $\iota 2$, ν , κ , λ , μ , σ , π , τ , ρ y σ (Adu-Bobie *et al.* 1998; Oswald *et al.* 2000; Tarr y Whittam, 2002; Zhang *et al.* 2002b; Blanco *et al.* 2003a, 2004b, 2005, 2006a; Garrido *et al.* 2006; Mora *et al.* 2009; Horcajo *et al.* 2012). El análisis filogenético revela la existencia de 5 grupos de intiminas relacionadas: (I) $\alpha 1$, $\alpha 2$, ζ , ν ; (II) $\beta 1$, $\beta 2$, δ , κ ; (III) $\gamma 1$, $\gamma 2$, θ , μ ; (IV) ι , λ ; (V) ϵ , η , ξ (Zhang *et al.* 2002b; Blanco *et al.* 2004b). Debido a que las secuencias nucleotídicas de las variedades de los genes $\gamma 2$ y θ son casi idénticas (99% homología en la región variable), no es posible su diferenciación por PCR. Lo mismo pasa con las intiminas δ y κ (98% homología en la región variable). Todas las cepas de ECVT del serotipo O157:H7 presentan la intimina $\gamma 1$. Dicha variedad también se encuentra en ECVT O145 y ECEP

O55:HNM. Las intiminas $\alpha 1$, $\alpha 2$, δ/κ y μ se encuentran en ECEP humanos. En contraste, las intiminas $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, ε y ζ se detectan principalmente en ECVT de origen humano y animal. La intimina $\beta 1$ se encuentra en ECEP y ECVT de origen humano y animal. Las intiminas $\alpha 2$, η , ι , λ , ν , ξ son raramente encontradas tanto entre ECEP como entre ECVT, como entre otros tipos de ECAE (Oswald *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2002b; Blanco *et al.* 2004a,b,c).

Gen de la enterohemolisina (*E-hlyA*)

Muchos ECVT producen un tipo de hemolisina plasmídica denominada enterohemolisina (*E-hlyA*) (Jerse *et al.* 1990; Barret *et al.* 1992; Schmidt *et al.* 1994, 1995; Beutin *et al.* 1995; Oswald *et al.* 2000). La enterohemolisina fue el primer factor de virulencia descrito en el plásmido pO157 (Schmidt *et al.* 1995). Se ha descrito que el 90% de los ECVT aislados de infecciones humanas son portadores del gen *E-hlyA* (Nataro y Kaper, 1998). Además, dicho gen se encuentra en muchos serotipos de ECVT, tales como O5:HNM, O26:H11, O84:H2, O103:H2, O111:HNM, O113:H21 y O157:H7 que se asocian comúnmente con enfermedades diarreicas y SUH, y por lo tanto, el gen *E-hlyA* se elige frecuentemente como identificador de ECVT (Beutin *et al.* 1989; Willshaw *et al.* 1992; Schmidt *et al.* 1995; Schmidt y Karch, 1996; Sandhu *et al.* 1997; Lehmacher *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2000b; Cookson *et al.* 2006b). El posible papel de *E-hlyA* en la patogénesis de ECVT sería la liberación de hierro a partir de eritrocitos y así facilitar el crecimiento de ECVT en el hospedador (Saitoh *et al.* 2008).

En un estudio realizado por Cookson y colaboradores (2007) observaron 6 subtipos de *E-hlyA* mediante el uso de una única endonucleasa de restricción utilizando la técnica de PCR-RFLP. En dicho estudio, los autores demostraron la asociación existente no solo entre la presencia de la *E-hlyA* y las variantes del gen *eae* en cepas de ECVT aisladas de ganado vacuno y ovino, sino también entre cepas *E-hlyA* y *eae*-positivas de ECEPa aisladas de dichos portadores.

En general, el gen *E-hlyA* se encuentra altamente conservado (> 95% de homología) entre la mayoría de cepas ECEPa y ECVT, pero como se ha demostrado por los datos del estudio de Cookson y colaboradores (2007), se pueden distinguir fácilmente diferentes subtipos *E-hlyA* por métodos de PCR-RFLP, con objeto de analizar la potencial patogenicidad y factores de virulencia asociados a estos subtipos. Hay datos que indican que *E-hlyA* también está presente en cepas *vt* negativas *eae* negativas de *E. coli*, pero los subtipos *E-hlyA* de estas cepas no han sido analizadas (Hornitzky *et al.* 2005; Boczek *et al.* 2006).

Gen de la adhesina autoaglutinante (*saa*)

Paton y colaboradores (2001) describieron en la cepa O113:H21 *eae* negativa, responsable del brote en Australia, una nueva adhesina (adhesina autoglutinante de ECVT, Saa) codificada

en un plásmido de elevado peso molecular (>90 kb). Esta adhesina Saa también se ha detectado en cepas ECVT *eae* negativas de los serotipos O8:H19, O20:H19, O91:H21 y O91:H14 (Etcheverría y Padola, 2013; Feng y Reddy, 2013; Amézquita-López *et al.* 2014; Kameyama *et al.* 2015).

Existen múltiples variantes del gen *saa* basadas en la presencia o ausencia de una serie de repeticiones en el extremo 3'. Se había planteado la hipótesis de que las variaciones de este extremo 3' son un mecanismo para la regulación bacteriana de la afinidad para la adhesión, y que variantes más cortas son menos adhesivas que las variantes más largas (Paton *et al.* 2001; Lucchesi *et al.* 2006). Esta hipótesis fue examinada con detalle en un estudio llevado a cabo por Toma y colaboradores (2008), en el que se verificó la presencia del gen en 32 cepas de ECVT diferentes, así como el comportamiento de adhesión de dichas cepas a las células HEp-2 y a las células Caco-2. Si bien se encontraron diferencias en el grado de adherencia en estas cepas, el estudio no pudo probar una correlación entre la longitud de la repetición en su secuencia y las capacidades adhesivas, ni tampoco entre los niveles de expresión del gen *saa* y las propiedades adhesivas (Toma *et al.* 2008).

Gen de la subtilasa (*subAB*)

Otro factor de virulencia asociado a los ECVT es la citotoxina subtilasa (SubAB), codificada en 2 genes cotranscritos (*subA* y *subB*) e implicada en la virulencia de las cepas ECVT *eae* negativas (Paton *et al.* 2004). Se ha sugerido que esta toxina podría potenciar los efectos de las verotoxinas o, incluso, causar patologías por ella misma (Paton y Paton 2005, 2010). Experimentos *in vivo* han demostrado que la SubAB es letal para las células Vero (Paton *et al.* 2004). Además, puede participar directamente en el mecanismo de la diarrea en niños (Gerhardt *et al.* 2013) y puede contribuir al SUH lesionando las células glomerulares endoteliales humanas (Amaral *et al.* 2013). Según los resultados obtenidos en un estudio llevado a cabo por Funk *et al.* (2013) la SubAB debe ser considerada como marcador de virulencia, especialmente en cepas de ECVT responsables de infecciones alimentarias. Orden y colaboradores (2011) demostraron que los genes *subAB* están ampliamente distribuidos entre las cepas de ECVT de rumiantes sanos, lo que sugiere que estas cepas pueden tener más importancia como patógenos para humanos de lo que se creía. Asimismo, los resultados obtenidos en un reciente estudio realizado por Fierz *et al.* (2017) también sugieren que la presencia de *subAB* en las cepas ECVT asociadas a infecciones en humanos está subestimada ya que se trata de un factor de patogenicidad emergente que hasta el momento no se estaba investigando en aislados de pacientes con infecciones.

La subtilasa es una toxina de tipo AB₅. Fue descrita por primera vez por Paton *et al.* (2004) que demostraron que esta citotoxina es letal para los ratones, y produce un extenso daño microvascular, trombosis y necrosis en múltiples órganos, incluyendo el cerebro, los riñones y el hígado (Paton *et al.* 2004). Fue denominada “subtilasa” porque su subunidad A de 35-kDa es

una serina proteasa de subtilasa, lejanamente relacionada con el producto del gen *BA_2875* de *Bacillus anthracis*. La subunidad B está relacionada con una proteína exportada de *Yersinia pestis*, y al igual que VT, forma un pentámero, que media la unión a los receptores de glicolípidos en la superficie de la célula diana. El prototipo de la citotoxina subtilasa (SubAB) se describió en la cepa 98NK2 del serotipo O113:H21 LEE-negativo, que fue responsable de un pequeño brote de SUH en Adelaida, Australia del Sur, en 1998 (Paton *et al.* 1999), que en la cepa 98NK2 se encuentra en un gran plásmido de virulencia designado pO113 (Paton *et al.* 2004).

En otro estudio realizado por Paton y Paton (2005) observaron que en la cepa 98NK2, el gen *subAB* estaba flanqueado en 3' por el gen que codifica para la adhesina autoaglutinante Saa (Paton *et al.* 2001), y además que un pilus tipo IV que incluye en su codificación el gen *pilS* (Srimanote *et al.* 2002) estaba localizado aproximadamente 7kb después. Las 16 cepas de ECVT SubAB-positivas analizadas en dicho estudio también fueron positivas para ambos genes *saa* y *pilS*. Sin embargo, la correlación encontrada no fue del 100%, ya que una cepa positiva para ambos genes flanqueantes, fue negativa para el gen *subAB*, mientras que otras 6 cepas *subAB*-negativas fueron positivas, bien para *saa*, o *pilS*.

Posteriormente, en un estudio llevado a cabo por Tozzoli y colaboradores (2010), se describió por primera vez la producción de SubAB por 2 cepas de *E. coli* VT negativas (ED591 y ED32), aisladas de casos no relacionados de diarrea infantil. La caracterización de los genes *subAB* mostró una similitud del 90% de la secuencia nucleotídica con la de la SubAB prototipo, localizada en el plásmido de virulencia de la cepa 98NK2 ECVT O113 (pO113). En ambas cepas, SubAB estaba físicamente asociada con el gen *tia*, un determinante genético de invasión de *E. coli* enterotoxigénico. Las cepas fueron negativas para el gen *saa*, localizado en pO113 y presente en muchas de las cepas SubAB-positivas descritas hasta ese momento. Los resultados de dicho estudio indicaban que la producción de SubAB no se limitaba a ECVT y sugerían que la isla de patogenicidad SubAB-*tia* estaría implicada en la difusión de los genes *subAB*, como una alternativa al plásmido pO113.

Estudios posteriores, corroboraron la existencia de diferentes variedades de SubAB (Orden *et al.* 2011). Orden y colaboradores (2011) secuenciaron el gen *subA* en 12 cepas y demostraron que en la mayoría de las cepas ECVT *subAB* aisladas de ganado bovino presentaba una identidad del 99% con el de la cepa 98NK2, mientras que el gen *subA* en la mayoría de las cepas ECVT *subAB* aisladas de pequeños rumiantes era casi idéntico a la cepa ED591 (cepa ECVT negativa, aislada en el estudio de Tozzoli *et al.* 2010). Estos autores propusieron los términos *subAB*₁ para describir los genes que codifican la SubAB de la cepa 98NK2 (VT+) asociada a ganado bovino, y *subAB*₂ para describir la SubAB de la cepa ED591 (VT-) asociada a pequeños rumiantes. Los resultados de este estudio demostraron la amplia distribución de los genes *subAB* entre las cepas ECVT aisladas de ganado ovino y caprino, sugiriendo nuevamente que estas cepas podrían ser de mayor significancia patogénica para humanos de lo que se había creído.

Sánchez y colaboradores (2012) también encontraron la nueva variante del gen *subAB* en 12 cepas ECVT del serotipo O128:H2 aisladas de ganado ovino, de ciervos y de una paciente con CH. Estas cepas eran todas portadoras del gen *tia* pero no del gen *saa*, lo que sugería que se trataba de la variante de SubAB codificada en una isla de patogenicidad junto con el gen *tia*. Al igual que en el estudio de Orden y colaboradores (2011), estos autores también encontraron que la mayoría de las cepas ECVT SubAB positivas aisladas de ganado ovino eran portadoras de la nueva variante de la SubAB descrita por Tozzoli y colaboradores (2010).

Por otro lado, Michelacci y colaboradores (2013) determinaron la secuencia completa de la isla de patogenicidad que contiene el operón SubAB₂ en el prototipo de la cepa de *E. coli* ED32 y describieron su contenido genético. Estos autores, también encontraron una cepa positiva para ambos subtipos de subtilasa (SubAB₁ y SubAB₂), así como para los genes *saa* y *tia*, sugiriendo la presencia de la isla de patogenicidad que codifica para la subtilasa y que estos autores denominaron SE-PAI, y un plásmido similar al descrito en la cepa prototipo 98NK2 O113. En este estudio también encontraron que el operón SubAB₂ estaba presente en una cepa ECET. Este hallazgo podría estar relacionado con la presencia del gen *tia* en SE-PAI, de hecho el gen *tia* fue descrito inicialmente como un gen de virulencia de ECET (Fleckenstein *et al.* 1996), sugiriendo que SE-PAI puede haber crecido como una estructura de mosaico, a través de eventos de recombinación que implicarían a ECET, antes de la adquisición de forma estable por ECVT LEE-negativas. Según los autores de este estudio, la alta prevalencia de genes *subAB₂* en ECVT de origen ovino, sugeriría que el ganado ovino puede representar un importante reservorio animal de cepas ECVT-LEE negativas *subAB₂*-positivas, y confirmaría el origen zoonótico de infecciones humanas. Por otro lado, los resultados obtenidos en un estudio llevado a cabo por Sánchez y colaboradores (2013) sugieren que los animales de caza, y principalmente los ciervos, pueden representar un importante reservorio animal de cepas ECVT *eae* negativas y *subAB₂* positivas, poniendo también de relieve el potencial riesgo de patogenicidad para seres humanos.

Funk y colaboradores (2013) detectaron una nueva variante de SubAB₂, y denominaron SubAB₂₋₁ a la variante cromosómica descrita anteriormente y SubAB₂₋₂ a la nueva variante cromosómica. Esta nueva variante fue relacionada con un gen cromosómico que hipotéticamente codifica una proteína de eflujo de la membrana externa (OEP). En este estudio también observaron cepas ECVT portadoras de ambas variantes de subAB₂. Los análisis de secuencias mostraron secuencias conservadas en los alelos con localización plasmídica y heterogeneidad en las secuencias de los genes cromosómicos de SubAB₂.

Recientemente, se ha descrito un aislado de corzo que resultó positivo en un análisis inicial para el gen *subAB*, pero negativo para el subtipado de las variantes (Nüesch-Inderbinen *et al.* 2015). Este aislado presentaba una nueva variante alélica *subAB₂* que ha sido designada como *subAB₂₋₃* y que se asoció con un gen que codifica una proteína de función aún desconocida, que se encuentra 527 pb después del *locus* subAB. La localización genética de

este operón SubAB no mostró ninguna similitud con los alelos *subAB*₂₋₁ y *subAB*₂₋₂. Para poder detectar esta nueva variante, que también estaría situada en el cromosoma, Tasara y colaboradores (2017) han diseñado un *primer* que, junto con otros previamente descritos, permiten su identificación.

Varios autores han descrito la presencia de *subAB* principalmente en cepas de ECVT *eae* negativas de los serogrupos no O157 tales como O77, O79, O105 y O146 (Paton y Paton 2010; Fierz *et al.* 2017), del serotipo O128:H2 de ganado ovino (Sánchez *et al.* 2012), y de otros ECVT de diversos orígenes (Slanec *et al.* 2009; Michelacci *et al.* 2013; Pereira *et al.* 2013). También se ha descrito en cepas asociadas a casos humanos de infección (Paton y Paton, 2005; Wolfson *et al.* 2009; Tozzoli *et al.* 2010; Michelacci *et al.* 2013; Fierz *et al.* 2017).

Gen de la serina proteasa (*espP*)

Una proteína autotransportadora importante en ECVT es EspP (serina proteasa). Esta proteína identificada en 1997, está codificada en el plásmido pO157 (Brunner *et al.* 1997) y tiene capacidad adhesiva (Peterson *et al.* 2010). Hay estudios que indican que esta proteína puede desempeñar un papel en la patogénesis de ECVT y en la gravedad de la enfermedad del SUH (Orth *et al.* 2010; Xicohtencatl-Cortes *et al.* 2010). Además, Dziva y colaboradores (2007) observaron que EspP influye en la colonización intestinal de los terneros y adherencia a las células epiteliales intestinales primarias de la especie bovina.

EspP es un miembro de los autotransportadores de la serina proteasa de enterobacterias y está entre las más abundantes proteínas secretadas de ECVT (Henderson y Nataro, 2001).

En la caracterización inicial de esta proteasa, Brunner *et al.* (1997) mostraron que EspP puede escindir el factor humano de coagulación V (FV). El FV es una glicoproteína de cadena única de 330 kDa presente en el plasma humano (Kane *et al.* 1986) y un componente crítico de la coagulación (Asselta *et al.* 2006). Luego, los autores plantearon la hipótesis de que la degradación local del FV por EspP, secretada por ECVT unido a la mucosa gastrointestinal, puede resultar en una reducción de la actividad de FV que conduce a la prolongación del tiempo de coagulación; por lo tanto EspP puede jugar un papel en la fisiopatología de diarrea y SUH mediante el aumento de la hemorragia en el tracto gastrointestinal (Brunner *et al.* 1997).

Así, según los resultados obtenidos en un estudio realizado por Kuo y colaboradores (2016) sugieren que *espP* puede tener un papel en la patogénesis de la CH, diarrea y SUH, pero no es ni un factor de virulencia necesario ni suficiente en la génesis de la enfermedad. Lo más probable es que EspP puede actuar a través de muchos mecanismos diferentes y en concierto con otros factores de virulencia como VT, E-hlyA y citotoxina subtilasa para mejorar la virulencia de ECVT en la formación de diarrea y SUH (Kuo *et al.* 2016). Además,

en este mismo estudio también se obtuvieron resultados que indican que EspP altera la hemostasis *in vitro* por la disminución de las actividades de los factores de coagulación V, VII, VIII y XII, y de la protrombina, mediante la reducción de la fuerza de coágulos y la aceleración de la fibrinólisis, y proporcionan evidencia adicional de un papel funcional para esta proteasa en la virulencia de ECVT y el desarrollo de SUH y diarrea.

Hasta la fecha, además de asociado al serotipo O157:H7, el gen *espP* se ha detectado en cepas de ECVT pertenecientes a 55 serotipos diferentes y portadores de 5 tipos de *espP*: α , β , γ , δ , y ϵ (Brockmeyer *et al.* 2007; Bielaszewska *et al.* 2009). De éstos, *espP* α aparece asociado con los serogrupos altamente patógenos (O157, O26, O111 y O145) (Brockmeyer *et al.* 2007; Khan *et al.* 2009).

Gen de la enzima catalasa-peroxidasa (*katP*)

El gen *katP* codifica para la actividad de la enzima catalasa peroxidasa, y fue identificado en el plásmido pO157 de cepas ECVT O157 (Brunder *et al.* 1996). Este gen se encuentra en todos los *E. coli* O157:H7 pero no se localiza en ECEP, ECET, ECEI ni ECEAgg. La enzima que codifica podría facilitar a *E. coli* O157:H7 la colonización del tracto intestinal al reducir el estrés oxidativo y mediante el aprovechamiento del oxígeno en condiciones de oxígeno disminuidos en las que se encuentra el intestino (Lim *et al.* 2010a). Este gen tiene un tamaño de 2,2 kb y es altamente homólogo a la catalasa peroxidasa bacteriana. La actividad de la enzima KatP de *E. coli* O157:H7 se demostró tanto en el citoplasma como en las fracciones del periplasma. La secuencia de señal N-terminal sugiere que esta enzima es transportada a través de la membrana citoplasmática (Brunder *et al.* 1996; Lim *et al.* 2010a).

Gen de la metaloproteasa (*stcE*)

Otro gen implicado en la virulencia es *stcE*. Codifica para una proteína de 95 kDa, proteína de gran tamaño, puesto que la mayoría de las metaloproteasas, tienen generalmente masas moleculares de 25 a 60 kDa (Grys *et al.* 2005). StcE juega un papel crítico en la colonización, desenmascarando proteolíticamente la superficie de la célula hospedadora para permitir la íntima adherencia de los ECVT a las células epiteliales del intestino, degradando y reduciendo la viscosidad de la capa mucosa intestinal. El gen *stcE* se encuentra localizado en el plásmido pO157 (Grys *et al.* 2005). Hay estudios que demuestran que la presencia de este gen, junto con el gen *katP* y los genes de la isla de patogenicidad LEE, podrían identificar un genotipo de cepas ECVT especialmente patógenas (Kobayashi *et al.* 2013).

1.6.2. ECVT: importantes patógenos emergentes

En la primera descripción de los ECVT, Konowalchuk y colaboradores (1977) descubrieron que algunas cepas aisladas de niños con diarrea en Canadá pertenecientes a los serogrupos O26 y O111 eran capaces de producir verotoxinas. En otras partes del mundo se estaban detectando, asimismo, cepas de diferentes serogrupos asociados con diarrea infantil, principalmente en el Reino Unido (Wade *et al.* 1979) y Nueva Zelanda (Wilson y Bettelheim, 1980). Estas cepas no habían aparecido repentinamente, ya que en un estudio retrospectivo realizado sobre cepas de *E. coli* aisladas de individuos sanos en los años 70, se demostró que ECVT O20:HNM estaban ya entonces presentes (Bettelheim y Wilson, 1982). Otros estudios retrospectivos realizados en Reino Unido, EE.UU. y Canadá sobre cepas de *E. coli* aisladas y serotipadas durante la década de los 70, sugieren que el serotipo O157:H7 era por aquel entonces poco frecuente (Griffin y Tauxe, 1991).

Probablemente el primer brote importante debido a un ECVT no O157 descrito en la literatura sea el sucedido en el norte de Virginia, EE.UU., en 1953-1954. Este fue un pico de un brote general ocurrido a lo largo de la costa este de EE.UU. e implicó también amplias zonas de Nueva Inglaterra. Se describieron casos en hospitales y guarderías que afectaron a neonatos, y en los que el principal organismo aislado era un *E. coli* del serogrupo O111. No se han llevado a cabo estudios para determinar si aquellas cepas eran productoras de verotoxinas, pero la clínica descrita así lo sugiere, particularmente debido a que un número concreto de casos se diagnosticaron como SUH. En la época se consideró que el agente responsable era un ECEP, sin embargo es mucho más probable que fuera un ECVT (Belnap y O'Donnell, 1955).

El primer caso de SUH descrito como tal fue en 1955 (Gasser *et al.* 1955) y se asoció 30 años después con una enteritis provocada por un ECVT (Karmali *et al.* 1985). No obstante, existe una referencia anterior asociada a la muerte de un soldado británico en 1918 en Salónica (Grecia) tras padecer síntomas de disentería, con lesiones histopatológicas muy probablemente causadas por un SUH asociado con ECVT (Bamforth, 1923; Tarr *et al.* 2005).

La infección por un ECVT del serotipo O157:H7 fue descrita por primera vez en 1982, en EE.UU., asociada a 2 brotes de CH que afectaron a 47 personas que habían comido en diversos restaurantes de comida rápida de la misma cadena (Riley *et al.* 1983; Wells *et al.* 1983). El ECVT causante de los brotes pertenecía a un serotipo (O157:H7) muy raramente aislado hasta la fecha, y que mostraba una peculiaridad con respecto a la mayoría de las cepas de *E. coli*, ya que era incapaz de fermentar el sorbitol.

Se cree que la relativamente reciente adquisición de fagos VT es responsable de la emergencia del ECVT O157 como nuevo patógeno. Procedería de un progenitor de menor patogenicidad modificada por transferencia horizontal y recombinación (Whittam *et al.* 1993, 1998; Feng *et al.* 1998, 2007; Wick *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2010). Concretamente de un ECEP

del serotipo O55:H7 dotado ya de un mecanismo de adhesión al epitelio intestinal (LEE). Feng y colaboradores (2007) describieron un modelo de la evolución del *E. coli* O157 a partir de un ancestro. El modelo, que se muestra en la Figura 4, sugiere una explicación de las diferencias genotípicas y fenotípicas entre las cepas, incluidos los cambios en la adquisición de los genes de las verotoxinas, la ganancia o pérdida de la motilidad y la capacidad para fermentar el sorbitol.

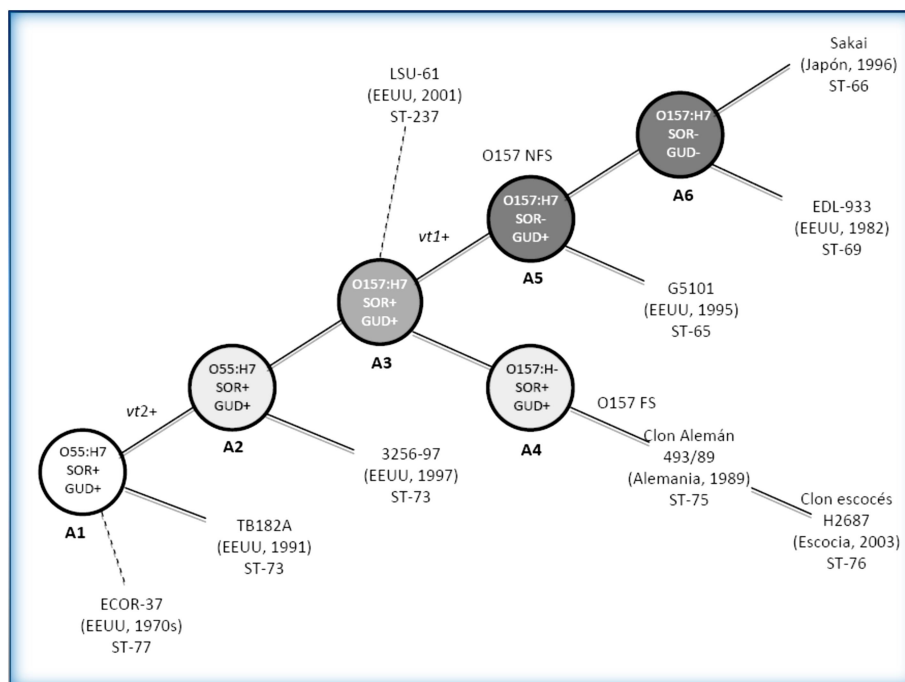


Figura 4. Evolución de la cepa O55:H7 a O157:H7. Adaptada de Feng *et al.* 2007

1.6.2.1. ECVT O157 y no O157

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

Tabla 7. Relación entre ECVT O157 y no O157 asociados a brotes y casos aislados.
Fuente: Herrera, 2015

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

Comparando la incidencia de los 2 grupos de ECVT (O157 y no O157) en distintos brotes, se observa que los brotes provocados por cepas no O157 se asocian con menor frecuencia al consumo de carne, agua y productos agrícolas, y parecen estar más relacionados a contagios persona-persona o al origen desconocido. En cambio los brotes provocados por ECVT O157 están claramente relacionados con el consumo de carne y agua. Estas diferencias pueden ser debidas en parte a que los métodos analíticos disponibles para detectar los ECVT O157 están más desarrollados o son más ampliamente utilizados; de ahí que el porcentaje de brotes asociados a ECVT no O157 por causas desconocidas sea tan elevado (Doyle *et al.* 2006) (Figura 5).

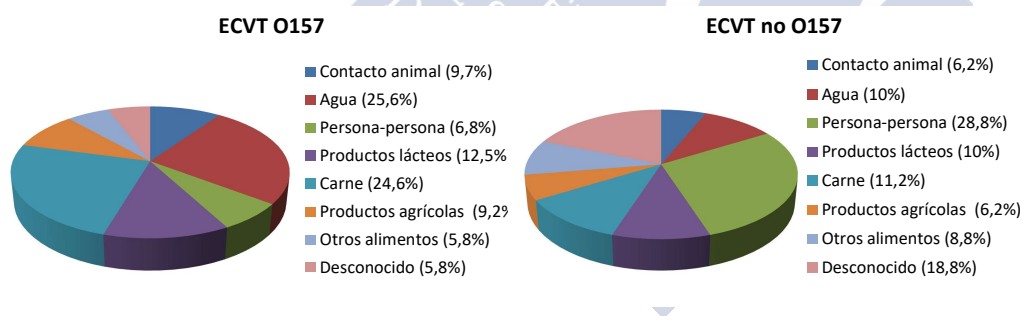


Figura 5. Origen de brotes a nivel mundial asociados a ECVT O157 y no O157.
Fuente: Doyle *et al.* 2006

1.6.2.2. ECVT O157

Desde su reconocimiento como patógeno en 1982 (Riley *et al.* 1983), el ECVT sorbitol-negativo del serotipo O157:H7 ha provocado un gran número de brotes de CH, la mayoría de los cuales han tenido lugar en EE.UU., Canadá, Japón y Reino Unido (Carter *et al.* 1987; Tarr *et al.* 1997; Nataro y Kaper, 1998; CDC, 2007; Marder *et al.* 2014; Heiman *et al.* 2015).

En estos países, el ECVT O157 ha llegado a considerarse como la causa principal de diarrea sanguinolenta (15% a 41%) y el segundo o tercer patógeno bacteriano más frecuentemente aislado de coprocultivos, después de *Salmonella* y *Campylobacter* spp. (Cahoon y Thompson, 1987; Pai *et al.* 1988; Slutsker *et al.* 1997). Dentro de los ECVT, el serotipo O157:H7 era considerado el principal causante de enfermedades en humanos en EE.UU. (Tarr *et al.* 2005), causando más de 96.000 casos de enfermedades diarreicas y 17 brotes anuales. Sin embargo, datos publicados por el CDC en el año 2010, apuntaban a un descenso en el número de infecciones, de tal manera que en EE.UU. el ECVT O157 sería el cuarto patógeno bacteriano más frecuentemente aislado, con una incidencia anual en torno a 1 caso por cada 100.000 habitantes (CDC, 2010).

El coste económico anual de las enfermedades debidas a infecciones producidas por ECVT O157 en EE.UU. se ha cifrado en 405 millones de dólares, 30 millones por asistencia médica y 5 millones de dólares en concepto de pérdidas de productividad, con un coste medio por paciente entre los 26 dólares de un individuo que no llega a necesitar asistencia médica hasta los 6,2 millones de dólares de un paciente que fallece a causa del SUH (Frenzen *et al.* 2005).

El brote más espectacular provocado por el ECVT O157 fue el que tuvo lugar en Japón en julio de 1996 (Yamasaki *et al.* 1997; Michino *et al.* 1999; Fukushima *et al.* 1999). Afectó a unas 10.000 personas, 1.000 de las cuales fueron hospitalizadas y al menos 12 murieron. La mayoría de los afectados eran niños de escuelas primarias y parvularios (Mora, 2002). El ECVT O157 también fue el causante de otro gran brote que tuvo lugar en Canadá en el año 2000 (Hrudey *et al.* 2003) en el que se vieron implicadas 2.300 personas, 27 de las cuales desarrollaron el SUH y 7 murieron. Este brote fue debido al consumo de agua. Además el ECVT O157 es el causante de otros muchos brotes en todo el mundo, algunos de los cuales, se detallan en la Tabla 8.

Además, según una revisión bibliográfica recientemente publicada por Heiman y colaboradores (2015), el ECVT O157 fue el causante de 390 brotes con 4.928 afectados, 1.272 hospitalizaciones y 33 muertes en EE.UU. durante el periodo 2003-2012. En el 65% de los casos la transmisión fue alimentaria, frente a un 10% de los casos debidos al contacto persona-persona o por contacto con animales. Sin embargo, la transmisión a través del agua solo ocurrió en el 4% de los casos.

Tabla 8. Principales brotes provocados por ECVT O157 a nivel mundial

Año	Nº de casos	SUH	Muertes	Vía de transmisión	País	Cepa	Referencia
1985	73		17	Sándwiches	Canadá	O157:H7	Carter <i>et al.</i> 1987
1990	243	2	4	Agua de pozo	EE.UU.	O157:H7	Swerdlow <i>et al.</i> 1992
1991	521	22	2	Carne picada	Canadá	O157:H7	Orr <i>et al.</i> 1994
1992-1993	>500	45	3	Hamburguesas	EE.UU.	O157:H7	Bell <i>et al.</i> 1994; Brandt <i>et al.</i> 1994; Davis, 1994; Tuttle <i>et al.</i> 1999)
1994	>100	9	1	Leche pasteurizada	Escocia	O157:H7	Upton y Coia, 1994
1995	633	2	0	Agua de grifo	Escocia	O157:H7	Jones <i>et al.</i> 1996
1995-1996	110	29	0	Desconocido	Suecia	O157:H7	Ziese <i>et al.</i> 1996
1996	66		1	Zumo de manzana sin pasteurizar	EE.UU.	O157:H7	CDC, 1997b
1996	12.680	121	12	Brotes de rábano	Japón	O157:H7	Michino <i>et al.</i> 1999; Fukushima <i>et al.</i> 1999; Yamasaki <i>et al.</i> 1997
1996	503	34	20	Carne	Escocia	O157:H7	Pennington, 1998
1996-1997	512		17	Carne	Escocia	O157:H7	Cowden <i>et al.</i> 2001
1997	332	1	0	Comida de restaurante	Reino Unido	O157:H7	Anónimo, 1997
1997	108	4	0	Brotes de alfalfa	EE.UU.	O157:H7	Como-Sabetti <i>et al.</i> 1997
1998	157	4	0	Agua de grifo	EE.UU.	O157:H7	Olsen <i>et al.</i> 2002
1999	329			Carne de vacuno	EE.UU.	O157:H7	Departamento de Salud de Illinois, 1999
1999	>1000	11	2	Agua de pozo	EE.UU.	O157:H7	Charatan, 1999
1999	159			Animales-Zoo	Canadá	O157:H7	Warshawsky <i>et al.</i> 2002
1999	143	6	0	Salami	Canadá	O157:H7	MacDonald <i>et al.</i> 2004
1999	127	14	2	Agua de pozo	EE.UU.	O157:H7	Novello, 1999; New York State, Dept of Health, 2000
1999	114	3	0	Leche pasteurizada	Reino Unido	O157:H7	Goh <i>et al.</i> 2002
2000	51	8	0	Contacto directo con animales en granja	Pensylvania	O157:H7	Crump <i>et al.</i> 2002
2000	2.300	27	7	Agua de bebida	Canadá	O157:H7	Hrudey <i>et al.</i> 2003
2000	102			Agua de riego	EE.UU.	O157:H7	Lee <i>et al.</i> 2002
2002	109	0	2	Ensaladas	Canadá	O157:H7	Bolduc <i>et al.</i> 2004

Año	Nº de casos	SUH	Muertes	Vía de transmisión	País	Cepa	Referencia
2004	108	15	0	Animales Zoo	EE.UU.	O157:H7	Davies <i>et al.</i> 2005
2005	120	7	0	Lechuga	Suecia	O157:H7	Söderström <i>et al.</i> 2005
2005	63	7	0	Contacto con animales en feria	Florida	O157:H7	CDC, 2005
2005	157	2	1	Carne	Reino Unido	O157:H7	Salmon, 2005
2006	49	9	0	Consumo de espinacas	Wisconsin	O157:H7	Wendel <i>et al.</i> 2009
2008	64	25	0	Consumo de carne	EE.UU.	O157:H7	CDC, 2010
2008	35	1	0	Consumo de carne	EE.UU.	O157:H7	CDC, 2010
2009	26	5	2	Consumo de carne de vacuno	EE.UU.	O157:H7	CDC, 2010
2011	15	4	2	Consumo de fresas contaminadas con heces de ciervo	Oregón	O157:H7	Laidler <i>et al.</i> 2013
2012	8	6	0	Consumo de hamburguesas	Francia	O157:H7	Barret <i>et al.</i> 2012
2012	13	8	0	Consumo de carne picada	Dinamarca	O157:H7	Soborg <i>et al.</i> 2013

1.6.2.3. ECVT no O157

Después de la aparición del ECVT O157 como patógeno, este microorganismo experimentó una amplia diseminación. No obstante, no se debe subestimar la importancia de los ECVT no O157 como causantes de infecciones en seres humanos, ya que un número importante de ellos han demostrado causar infecciones (Johnson *et al.* 2006; Hedican *et al.* 2009; Coombes *et al.* 2011; Couturier *et al.* 2011; Bielaszewska *et al.* 2013; Kobayashi *et al.* 2013). Muestra de ello es la existencia de un gran número de brotes documentados (Caprioli *et al.* 1994; Goldwater y Bettelheim, 1995, 1996, 1998; Blanco *et al.* 1996c; Paton *et al.* 1996; McCarthy *et al.* 2001; Werber *et al.* 2002, 2008b; Brooks *et al.* 2004; Schimmer *et al.* 2006, 2008; Bradley *et al.* 2012; Taylor *et al.* 2013), los más importantes se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Principales brotes provocados por ECVT no O157 a nivel mundial

Año	Nº de casos	SUH	Muertes	Vía de transmisión	País	Cepa	Referencia
1984	100		0	Desconocido	Japón	O145:HNM	Johnson <i>et al.</i> 1996
1991	234			Desconocido	Japón	O111:HNM	Banatvala <i>et al.</i> 1996
1996	131	0	0	Ensaladas	Japón	O118:H2	Hashimoto <i>et al.</i> 1999
2000	102			Agua de bebida	EE.UU.	O111	Lee <i>et al.</i> 2002
2004	107	0	0	Carne	Japón	O111:HNM	Kato <i>et al.</i> 2005
2004	213			Sidra no pasteurizada	EE.UU.	O111	Vojdani <i>et al.</i> 2008
2006	17	10	1	Embutido	Noruega	O103:H25	Schimmer <i>et al.</i> 2008
2006	12	0	0	Desconocido	Japón	O103:H2	Muraoka <i>et al.</i> 2007
2006	33	0	0	Desconocido	Japón	O26:H11	Sonoda <i>et al.</i> 2008
2007	135		0	Queso pasteurizado	EE.UU.	O26	CDC, 2013
2007	20			Salchichas de ternera	Dinamarca	O26:H11	Ethelberg <i>et al.</i> 2009
2008	341	25	1	Comida de restaurante	EE.UU.	O111:HNM	Oklahoma State Dept of Health, 2009
2011	3.816	845	54	Semillas/brotes de fenogreco	Alemania Francia	O104:H4	Blanco, 2012
2011	181		0	Carne cruda	Japón	O111	National Institute of Infectious Diseases, Japan, 2012
2012	1.642	-	-	Rábano, (Kimchi)	Corea	O169	Hu <i>et al.</i> 2013

El CDC estima que aproximadamente un tercio de las infecciones provocadas por ECVT en EE.UU. son consecuencia de serotipos no O157 (Kaspar *et al.* 2010). Algunos estudios apuntan a que los ECVT no O157 puede causar diarrea en ese país con la misma frecuencia que los ECVT O157, pero que sin embargo su identificación es menos frecuente en casos de patologías graves, como el SUH.

El CDC publicó en 2013 los datos de incidencia de infecciones por ECVT confirmadas y reportadas en los EE.UU. durante el periodo 1996-2011. Estos datos indican un aumento significativo del número de infecciones por ECVT no O157 desde el año 2004 (CDC, 2013). De la misma manera, datos extraídos de los sumarios de enfermedades infecciosas de declaración obligatoria de ese país muestran un aumento del porcentaje de casos de infecciones asociadas con ECVT no O157, pasando éste de un 5% en 2002 a un 16% en 2005.

Sin embargo, y aunque se aprecia un aumento significativo de los casos de infecciones por ECVT no O157 en ambos informes, existen indicios de que, en general, este aumento puede deberse a la introducción de nuevos métodos para la detección de diferentes serotipos de ECVT. Un estudio de vigilancia realizado en EE.UU en un área catalogada como de baja incidencia en ECVT, en el que se aplicaron nuevas técnicas en cuanto a la detección de ECVT no O157, reportó un aumento del número de casos de <1 a 11 casos/año/100.000 habitantes, y un 56% de las cepas aisladas fueron no O157 (Lockary *et al.* 2007). Gould (2009) realizó un estudio que también apoya esta teoría, determinando que en EE.UU. el aumento en la detección de ECVT no O157 está directamente relacionado con la introducción en laboratorios de técnicas moleculares para la detección de ECVT no O157.

En cuanto a la Unión Europea (datos de la Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2011), durante el periodo 2005-2009 la media de personas infectadas por ECVT fue de 3.250 (0,7 casos por 100.000 habitantes), afectando sobre todo al Reino Unido y Alemania (38% y 25% de los casos, respectivamente), mientras que en España solo se declaró una media de 16,4 casos, lo que representa <0,1 casos por 100.000 habitantes (0,5% de los casos de Europa).

Los ECVT causantes de infecciones en seres humanos pertenecen a un amplísimo abanico de serotipos, de manera que se ha detectado la producción de verotoxinas en cepas pertenecientes a 500 serotipos (Blanco *et al.* 2004; Gyles, 2007) (Tabla 3). Entre los más frecuentes destacan: O26:H11, O103:H2, O104:H21, O111:HNM, O111:H2, O111:H8, O113:H21, O117:H4, O118:H2, O119, O121:H19, O128:H2, O145:H28/HNM, O157:H7, O157:HNM y ONT:H19 (Boerlin *et al.* 1999; Bettelheim 2000, 2003; Blanco *et al.* 2003a, 2004a; Beutin *et al.* 2004; Rivero *et al.* 2010; Kaftyreva *et al.* 2013; Taylor *et al.* 2013). Sin lugar a dudas, los ECVT de los serotipos O26:H11/HNM, O103:H2, O111:HNM y O145:H28/HNM son los que adquieren una mayor importancia clínica después del ECVT del serotipo O157:H7. Otros serotipos frecuentemente descritos en pacientes humanos con CH o SUH son: O91:H21/HNM, O113:H21, O118:H16, O121:H19, O128:H2/HNM y O146:H21. En Europa continental y Australia los casos esporádicos de infecciones por ECVT no O157 son mucho más frecuentes que los causados por ECVT O157, mientras que en el Reino Unido, EE.UU., Canadá y Japón predominan las cepas del serotipo O157:H7 (Pai *et al.* 1988; Karmali, 1989; Jonhson *et al.* 1996; Paton *et al.* 1996, 1999; Karch *et al.* 1997; Beutin *et al.* 1998, 2003, 2004; Beutin, 1999; Goldwater y Bettelheim 1998; Wang y Doyle 1998; Boerlin *et al.* 1999; Morabito *et al.* 1999; Schmidt *et al.* 1999b; Scheutz *et al.* 2000, 2001; Wieler *et al.* 2000; Yatsuyanagi *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2000a,b,2002a; Caprioli *et al.* 2001; Eklund *et al.* 2001; Tozzi *et al.* 2001; Gerber *et al.* 2002; Jelacic *et al.* 2003; Pulz *et al.* 2003, Brooks *et al.* 2004; Sonntag *et al.* 2004; Vaz *et al.* 2004; Leomil *et al.* 2005).

En la actualidad, el aislamiento de cepas de ECVT no O157 sigue aumentando al tiempo que aparecen nuevos serotipos capaces de provocar infección en seres humanos. Así, por ejemplo, en las últimas décadas se ha producido una emergencia del serotipo O111:HNM en

Italia, Dinamarca y Australia; del O111:H2 en Alemania; y del O103:H2 en Francia y EE.UU. De igual manera, cepas del serogrupo O118 (H12, H16 y H30) están emergiendo en muchas partes del mundo como causantes de infecciones en seres humanos (Bettelheim, 2003; Liu *et al.* 2008). Destacan también los serotipos emergentes O100:HNM y O127:H40 aislados en pacientes en Austria (Orth *et al.* 2006).

1.6.3. Reservorios y fuentes de transmisión de los ECVT

1.6.3.1. Ganado bovino y pequeños rumiantes: principales reservorios

Está claramente demostrado que el ganado bovino actúa como principal reservorio de ECVT. No obstante, también los pequeños rumiantes, ovino y caprino son importantes portadores de ECVT (Beutin *et al.* 1993; Heuvelink *et al.* 2002; Orden *et al.* 2008; Sánchez *et al.* 2009b; Pinaka *et al.* 2013; Gencay 2014). Más de la mitad de los terneros, corderos y cabritos llevan en su microbiota intestinal ECVT, muchos de los cuales pertenecen a los mismos serotipos O:H que las cepas que causan infecciones en seres humanos (Blanco *et al.* 1988, 1993a, 1994, 2001, 2003b, 2005; Zhao *et al.* 1995; Armstrong *et al.* 1996; Kudva *et al.* 1996, 1997; Heuvelink *et al.* 1998; Stewart y Flint 1999; Bettelheim, 2000; Parma *et al.* 2000; Pradel *et al.* 2000; Djordjevic *et al.* 2001, 2004; Kobayashi *et al.* 2001; Rasmussen y Casey 2001; Nielsen *et al.* 2002; Urdahl *et al.* 2002; Leomil *et al.* 2003; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Wani *et al.* 2003; Fukushima y Seki 2004; Meichtri *et al.* 2004; Mercado *et al.* 2004; Padola *et al.* 2004; Pearce *et al.* 2004; Shaw *et al.* 2004; Zweifel *et al.* 2004, 2005; Cortés *et al.* 2005; Hornitzky *et al.* 2005; Irino *et al.* 2005; La Ragione *et al.* 2005; Liebana *et al.* 2005; Sheng *et al.* 2005; Vali *et al.* 2005; Geue *et al.* 2009; Sánchez *et al.* 2009b). Incluso, estudios llevados a cabo en Canadá y Francia han demostrado que la incidencia de SUH en infecciones de ECVT en humanos está directamente relacionada con indicadores de densidad de ganado vacuno (Valcour *et al.* 2002; Haus-Cheymol *et al.* 2006).

En los primeros estudios los animales colonizados por ECVT del serotipo O157:H7 no superaban el 2% de los muestreados. No obstante, estudios posteriores que emplearon técnicas muy sensibles indican que entre el 10% y el 20% de los terneros eran positivos para estos microorganismos. En un estudio efectuado en Holanda en 1996 se detectaron ECVT O157 en 7 de las 10 explotaciones de ganado vacuno examinadas, con un 7% (75 de 1.152) de animales portadores (Heuvelink *et al.* 1998). En el estudio holandés se detectó un pico de incidencia (15%) en los meses más calurosos del año (julio a septiembre). En otro estudio llevado a cabo en ganado vacuno sacrificado en un matadero en Italia en 1997, se comprobó que el 19% (31 de 160) de los terneros cebados y el 24% (24 de 101) de las vacas de leche sacrificadas portaban en su contenido intestinal ECVT O157 (Bonardi *et al.* 1999). Chapman *et al.* (1997) aislaron el ECVT O157 en el 16% (752 de 4.800) de cabezas de ganado vacuno sacrificadas en un

matadero de Inglaterra. Synge (1999) y Cizek y colaboradores (1999) encontraron resultados similares en Escocia (15%, 65 de 441) y Checoslovaquia (20%, 72 de 365), respectivamente. Estudios realizados en Argentina (primer país en casos de SUH por habitante del mundo) demostraron que la prevalencia de ECVT en ganado vacuno varía entre el 22% y el 67% (Sanz *et al.* 1998; Parma *et al.* 2000; Chinen *et al.* 2003; Meichtri *et al.* 2004; Mercado *et al.* 2004; Padola *et al.* 2004). Estos datos contrastan con los publicados por la EFSA en el año 2012, según los cuales, en Europa la prevalencia de ECVT en ganado vacuno era del 7,4% y del 1,8% para ECVT O157. En este caso, la prevalencia se calculó con los datos de 7 países (Austria, Dinamarca, Estonia, Finlandia, Alemania, Italia y Suecia). Sin embargo, si analizamos los países individualmente, vemos grandes diferencias entre ellos. Por ejemplo, para el mismo periodo (2012) Austria reportó una prevalencia del 32,1% de ECVT en ganado vacuno, mientras que Dinamarca, Estonia, Finlandia, Italia y Suecia reportaron una baja prevalencia de ECVT y de ECVT O157 en particular (del 1,7% al 8,4%) (EFSA/ECDC, 2014). En lo que respecta a España, en un estudio realizado en 2013, se detectó ECVT O157 en el 14,7% de las muestras analizadas (Ramoneda *et al.* 2013).

Los ECVT forman parte de la microbiota intestinal y se comportan como las múltiples cepas de otros tipos de *E. coli* no patógenos que integran la microbiota transitoria. Los animales colonizados pueden eliminar el ECVT O157 durante varias semanas (Besser *et al.* 1997). No obstante, incluso se ha apuntado que algunas cepas de ECVT pueden persistir durante años en un mismo rebaño, lo que contribuiría a explicar el papel del ganado bovino como reservorio (Caprioli *et al.* 2005; Geue *et al.* 2009). En este sentido, Widiasih y colaboradores (2004) observaron una duración de la eliminación fecal de ECVT O157 en ganado bovino muy variable, de entre menos de 1 semana y 10 semanas, y en concentraciones mucho más altas que en el caso de ECVT O26, cuya eliminación se prolongó entre menos de 1 semana y 3 semanas. Se desconocen las razones que provocan el aumento drástico de animales colonizados y reducen posteriormente su número hasta la desaparición total de portadores en una determinada granja (Armstrong *et al.* 1996; Blanco *et al.* 2001; Hancock *et al.* 2001).

Se han detectado ECVT O157 en heces de ganado bovino en concentraciones de 4×10^7 UFC/g. Sin embargo, en la mayoría de los casos las concentraciones oscilan entre menos de 10 y 100 UFC/g (Fegan *et al.* 2004; Widiasih *et al.* 2004). No parece que existan diferencias en los niveles de prevalencia o en las concentraciones fecales de ECVT O157 entre el ganado bovino en sistemas de pastoreo y animales de cebo (Fegan *et al.* 2004). Algunos trabajos han constatado que, dentro del ganado bovino, ciertos animales eliminan el ECVT O157 con las heces a altas concentraciones durante varias semanas, por lo que se les conoce como eliminadores persistentes (Naylor *et al.* 2003; Chase-Topping *et al.* 2008; Karmali *et al.* 2010). Estos animales se encuentran colonizados por el microorganismo principalmente en el recto

terminal, contribuyendo de manera desproporcionada a la contaminación ambiental y de las canales bovinas (Gyles, 2007; Chase-Topping *et al.* 2008).

Entre los años 1993 y 1995 el LREC realizó un amplio muestreo en el que se recogieron las muestras fecales de un total de 589 vacas y 480 terneros en 51 explotaciones ganaderas y en un matadero de la provincia de Lugo (Blanco M. *et al.* 1996a, 1997d). Los ECVT se aislaron frecuentemente tanto en animales jóvenes (37%) como adultos (27%). No obstante, las cepas del serotipo O157:H7 únicamente se recuperaron de 8 (2%) de los 480 terneros y de ninguna de las 589 vacas muestreadas. También es interesante destacar que todas las cepas altamente virulentas del serotipo enterohemorrágico O157:H7 se aislaron de animales jóvenes.

En los años 1998 y 1999 el LREC realizó un nuevo muestreo en 145 explotaciones de ganado vacuno. La gran mayoría eran cebaderos y se repartían en las 4 provincias gallegas. Las cepas verotoxigénicas O157:H7 se encontraron en 55 (12%) de los 471 terneros muestreados. Aunque solamente se muestrearon de 3 a 5 animales por cebadero, se detectaron ECVT O157 en 32 (22%) de las 145 explotaciones examinadas en Galicia. Resultados similares encontramos en terneros de cebaderos y mataderos localizados en la provincia de Navarra. En uno de los cebaderos se llegaron a detectar ECVT O157 en el 25% de los animales (13 de 56). Por lo tanto, los resultados encontrados en España son similares a los encontrados en otros países, e indican que aproximadamente el 10% de los terneros llevan en sus heces ECVT O157 altamente virulentos para los seres humanos (Blanco *et al.* 2001). En contraste, menos del 1% de los corderos y cabritos muestreados en España están colonizados por el ECVT O157 (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Cortés *et al.* 2005).

Además de su condición de portadores asintomáticos de ECVT, el ganado bovino también se ve afectado por estos patógenos, de hecho, los ECVT también se aíslan con frecuencia en terneros con diarrea que tienden a ser recurrentes incluso con el tratamiento, dando lugar a deshidratación, debilidad y una considerable disminución de los índices de crecimiento (Caprioli *et al.* 2005). En los casos más graves es posible detectar los ECVT junto con otros agentes infecciosos causantes de diarrea como criptosporidios, rotavirus, coronavirus, coccidios y ECET. Las complicaciones sistémicas que suelen acompañar a las infecciones por ECVT en seres humanos, como puede ser el SUH, no se observaron en los bovinos jóvenes, debido probablemente a la ausencia de receptores específicos en las células endoteliales de sus glomérulos renales (Mainil, 1999).

Las cepas de ECVT patógenas para bovinos jóvenes normalmente pertenecen a serogrupos como O5, O26, O103, O111, O118, O145 y O157 (Blanco *et al.* 1988; Blanco *et al.* 1994; Wieler *et al.* 1996a; Mainil y Daube, 2005), aunque se han descrito muchos otros serogrupos. En particular, las cepas enterohemorrágicas del serogrupo O118 se han aislado

frecuentemente de terneros con diarrea en Alemania (Wieler *et al.* 1998), habiéndose demostrado asimismo su transmisión al hombre (Beutin *et al.* 2000c). En estudios realizados en Alemania (Wieler *et al.* 1992), Brasil (Leomil *et al.* 2003; Aidar-Ugrinovich *et al.* 2007) o Corea del Sur (Lee *et al.* 2008), los ECVT se han aislado con mayor frecuencia en terneros con diarrea que en terneros sanos. No obstante, otros estudios han encontrado mayores niveles de eliminación fecal de ECVT en animales sanos que en animales con diarrea (Randall *et al.* 1997).

Por otro lado, Blanco *et al.* (2003) llevaron a cabo un estudio en colaboración con la Facultad de Veterinaria de Cáceres en el año 1997. Tras estudiar 1.300 muestras procedentes de 93 explotaciones de Extremadura, se encontró que el 0,4% de los corderos estaban colonizados por ECVT O157 y el 36% por ECVT no O157. El 72% de las cepas pertenecía a alguno de los siguientes 12 serotipos: O5:HNM, O6:H10, O91:HNM, O117:HNM, O128:HNM, O136:H20, O146:H8, O146:H21, O156:HNM, O166:H28 y ONT:H21. Los serototipos de los ECVT ovinos resultaron ser diferentes a los ECVT de origen bovino, sin embargo muchos de ellos también se han encontrado en cepas verotoxigénicas de origen humano. Posteriormente, en otro estudio llevado a cabo en colaboración con las Facultades de Veterinaria de Madrid y Murcia en el año 2003 (Cortés *et al.* 2005), se procesaron 222 muestras fecales de cabritos y cabras de 12 granjas de Murcia. En este estudio, se encontró que el 48% de los animales estaban colonizados por cepas ECVT no O157 mientras que no se detectaron ECVT O157. Siendo los serotipos más frecuentes: O5:HNM, O76:H19, O126:H8, O146:H21, ONT:HNM y ONT:H21. No obstante, el 16% de las cepas de ECVT caprinas pertenecieron a serotipos implicados en el SUH.

En un estudio realizado por Madzingira, (2016) observaron que el ganado ovino (heces, lana y carne de oveja contaminada) era portador de cepas ECVT de los serogrupos O103, O145, y del serotipo O157:H7 y, que podrían causar patologías clínicas en seres humanos.

Existen estudios en los que se pudo demostrar que los ECVT presentes en los animales fueron los causantes de infecciones en seres humanos por contacto directo. En Finlandia se detectaron infecciones por ECVT de los serotipos O103:H2, O145:H28 y O174:H21 en los residentes en una granja de vacuno. Estas mismas cepas se aislaron también en los animales de la granja, incluso hasta 4 meses más tarde (Heinikainen *et al.* 2007). En Dinamarca, otra infección por un ECVT del serotipo O111:HNM que afectó a una niña, pudo ser, o bien que estuvo jugando con los animales de una granja, o bien a la leche cruda que tomó en esa misma granja (Møller Nielsen *et al.* 2005). Werber y colaboradores (2007) realizaron un estudio epidemiológico en donde determinaron que en niños menores de 3 años el contacto directo con los animales supone el principal riesgo de contagio, mientras que en los niños mayores de 9 años, es el consumo de carne de rumiantes la causa más frecuentemente asociada con la

infección. En otro estudio realizado en Nueva Zelanda (Jaros *et al.* 2013), los autores asociaron las infecciones esporádicas por ECVT en seres humanos al contacto directo con los animales y a la exposición al medio ambiente, y apuntaron a los rumiantes como la fuente más importante de dichas infecciones.

1.6.3.2. Otros animales como reservorio de ECVT

En Alemania, Beutin y colaboradores (1993) analizaron las muestras procedentes de animales sanos de 7 especies distintas y aislaron ECVT en el 8% de las muestras de origen porcino y encontraron los serotipos O6:H7, O9:HNM, O91:HNM, O100:HNM, O141:H4.

En España, nuestro grupo de investigación aisló ECVT de lechones con diarrea (4%) y de cerdos con enfermedad edematosa (15%) con relativa frecuencia. La gran mayoría de las cepas pertenecían a los serotipos O138:HNM, O138:H14 y O141:K8 (González y Blanco, 1985; Garabal *et al.* 1995; Blanco *et al.* 1997b).

En Holanda, Heuvelink y colaboradores (1999a) analizaron el contenido rectal de cerdos en mataderos y encontraron que el 1% de los cerdos era portador del ECVT O157. Por otro lado, en Canadá, DesRosiers y colaboradores (2001) también aislaron ECVT en el 3% de las muestras fecales de ganado porcino. Entre las cepas aisladas en Canadá no se encontró ninguna del serotipo O157:H7. La mayoría de las cepas pertenecían a los serotipos O8:H9, O8:H19, O20:HNM, O38:HNM y O100:HNM. Los serotipos encontrados entre las cepas porcinas en Canadá fueron muy diferentes a los encontrados entre las cepas de ECVT causantes de infecciones en humanos.

En otros estudios realizados en países europeos se encontraron tasas de prevalencia de ECVT O157 en heces de cerdos en un rango variable, de entre el 0,2% y el 2% (Johnsen *et al.* 2001; Bonardi *et al.* 2003; Schouten *et al.* 2005). Durante el periodo 2007-2010, 8 países miembros de la UE reportaron datos sobre la detección de ECVT en cerdos, cuya prevalencia variaba entre el 0% y el 10,8%, y tan solo Alemania detectó ECVT O157, aunque a niveles muy bajos, variando entre el 0,1% y el 0,6% (EFSA/ECDC, 2012).

Meng y colaboradores (2014) también llegaron a la conclusión de que el ganado porcino es un reservorio importante de ECVT pero que tiene un potencial bajo de causar enfermedades en humanos.

También se han aislado cepas ECVT en animales de compañía. Así, Beutin y colaboradores (1993) las detectaron en su estudio en el 14% de los gatos y en el 5% de las muestras de perros. Encontrando los serotipos O17:HNM, O116:HNM entre las cepas aisladas de perros; y O6:H1 y O21:H14 entre las cepas aisladas de gatos. En España, los ECVT también

se aislaron del contenido intestinal de un gato sano (4%) (O121) (Blanco *et al.* 1993c). En Canadá, Hammermueller y colaboradores (1995) detectaron que el 17,2% de los perros eran positivos para ECVT. En otro estudio en Reino Unido el 28,1% de los perros resultaron portadores de ECVT pero tampoco se detectó ningún ECVT O157 (Sancak *et al.* 2004). En Japón, en un estudio realizado entre 1996 y 1998 en perros y gatos, el ECVT O157 se aisló en el 0,16% de los perros (Kataoka, 2010). En 2007 se detectó un caso de transmisión de ECVT O157 por perros en el Norte de Gales (Hogg *et al.* 2009). De forma global, todos estos estudios no identifican a los perros como un factor de riesgo significativo de transmisión de infección por ECVT a humanos.

Los ECVT también se han aislado de otros rumiantes, como el búfalo de agua (Galiero *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2007; Vu-Khac y Cornick, 2008), el bisonte americano (Reinstein *et al.* 2007) y diversas especies de rumiantes salvajes, tanto en libertad como en cautividad. El ECVT O157 se ha aislado repetidamente a partir de muestras fecales de ciervos en EE.UU., tanto en estudios realizados sobre muestras recolectadas del suelo (Rice *et al.* 1995; Sargeant *et al.* 1999) como en aquellos llevados a cabo con muestras tomadas directamente de animales abatidos en cacerías (Fischer *et al.* 2001; Renter *et al.* 2001; Dunn *et al.* 2004). Los ECVT no O157 se han aislado en ciervos en libertad en Japón (Asakura *et al.* 1998; Fukuyama *et al.* 1999) y en ciervos, muflón, gamo, y corzo en libertad en Europa (García-Sánchez *et al.* 2007; Sánchez *et al.* 2009a). Los ECVT no O157 se han aislado asimismo de rumiantes salvajes en cautividad, incluyendo especies como ciervo, muflón, gamo, yak, axis, elán, ciervo del padre David, cervicabra y oveja de Somalia (Leotta *et al.* 2006).

Otro estudio llevado a cabo en España por Sánchez y colaboradores (2010a) en heces de jabalíes sacrificados en cacerías, puso también de manifiesto que este tipo de animales podrían ser un reservorio de patógenos para el hombre. Así, estos autores detectaron el ECVT O157 y ECVT no O157 en 3,3% y 5,2% de los animales analizados respectivamente.

Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado en Galicia por Mora *et al.* (2012). En este estudio se analizaron muestras fecales de 179 corzos, 262 jabalíes y 260 zorros. Se aislaron cepas ECVT no O157 en el 52,5%, 8,4% y 1,9% de las mismas, respectivamente, y solo se aislaron cepas ECVT O157 en el 0,56% de los corzos y 0,38% de los jabalíes. Globalmente, el 40% de los animales silvestres muestreados portaban ECVT que compartían un perfil similar a los aislados de casos clínicos humanos en cuanto a la combinación de serotipo, filogrupo, perfil de virulencia, tipo de intimina y subtipo de verotoxina. Además, las cepas aisladas de animales silvestres de los serotipos O5:HNM, O26:[H11], O76:H19, O145:[H28], O146:H21 y O157:H7 mostraron perfiles de PFGE con una similitud superior al 85% con cepas de ECVT humanas, confirmando que, aunque no sean reservorio principal, la fauna silvestre es portadora de cepas potencialmente patógenas para el hombre y parece jugar un papel importante en el mantenimiento de los ECVT.

También hay estudios que demuestran que las aves pueden ser reservorio de los ECVT (Chandran y Mazumder, 2014). Morabito y colaboradores (2001) analizaron muestras fecales de paloma y detectaron la presencia de ECVT en el 11% de los animales. Se identificaron 6 serogrupos diferentes, pero la mayoría de los aislamientos pertenecía a 3 de ellos (O45, O18 y O75). Además, las palomas parecen ser un reservorio natural del ECVT portador del subtipo de verotoxina VT2f (Schmidt *et al.* 2000).

Makino y colaboradores (2000) investigaron las muestras fecales de gaviotas en Japón y aislaron 2 cepas de ECVT de los serotipos O136:H16 y O153:HNM del mismo animal. Según los autores, estas aves podrían ser elementos importantes en la diseminación de ECVT.

Los ECVT también se aislaron, en caballos (Chalmers *et al.* 1997; Pichner *et al.* 2005), en conejos domésticos (Blanco JE *et al.* 1996a) y silvestres (Pritchard *et al.* 2001; Scaife *et al.* 2006), alpacas y roedores (Leotta *et al.* 2006), pavos (Doane *et al.* 2007), gallinas de puesta (Schouten *et al.* 2005; Wasteson *et al.* 2005; Dipineto *et al.* 2006), cuervos (Ejidokun *et al.* 2006), estorninos (Nielsen *et al.* 2004) o gaviotas (Wallace *et al.* 1997; Makino *et al.* 2000).

1.6.3.3. Principales alimentos implicados en la transmisión

Durante las operaciones de procesado de las canales en matadero, y especialmente durante el desollado y la evisceración, llegan a las superficies de las canales cepas de *E. coli* procedentes de la microbiota intestinal del animal. Lo mismo ocurre durante el ordeño, en el que hay riesgo de contaminación de la leche con bacterias intestinales. Si la cepa que llega es altamente patógena (ECVT O157), la única forma de evitar la toxiinfección alimentaria es calentar la carne o pasteurizar la leche hasta garantizar la inactivación bacteriana. Especialmente peligrosas resultan la carne picada y productos derivados como las hamburguesas, ya que al encontrarse los microorganismos en toda su masa, no es suficiente con calentar la parte superficial. De hecho, la mayoría de los brotes provocados por los ECVT se han debido al consumo de hamburguesas y por ello la CH es conocida en los países anglosajones como “la enfermedad de las hamburguesas”. Además, las heces de los animales pueden contaminar el medio ambiente, en especial las aguas de riego, que a su vez contaminan verduras y frutas. (Doyle *et al.* 1997; Meng *et al.* 1998; Sheridan y McDowell, 1998; De Boer y Heuvelink, 2001; Nissen y Nesbakken, 2001; Mueller *et al.* 2003; Vogt y Dippold, 2005; Schimmer *et al.* 2006).

Aunque la mayoría de los brotes y casos esporádicos de infección por ECVT se han asociado al consumo de alimentos cárnicos mal cocinados de origen bovino, como los pasteles de carne picada (Griffin *et al.* 1988; Sekse *et al.* 2009; CDC 2011a, 2014) o las salchichas con carne de vacuno (Ammon *et al.* 1999; Ethelberg *et al.* 2009; Sekse *et al.* 2009), en el ciclo de transmisión aparecen implicados otros alimentos (Tabla 10) como brotes de rábanos (WHO

1996, 1997), brotes de alfalfa (CDC, 1997a; Ferguson *et al.* 2005), lechuga (Ackers *et al.* 1998; Hilborn *et al.* 1999; Söderström *et al.* 2005, 2008; Taylor *et al.* 2013; Marder *et al.* 2014; Mazaheri *et al.* 2014; Heiman *et al.* 2015), espinacas (Grant *et al.* 2008; Wendel *et al.* 2009), ensaladas listas para el consumo (Bolduc *et al.* 2004), patatas (Morgan *et al.* 1988), sidra (Besser *et al.* 1993; Zhao *et al.* 1993; Hilborn *et al.* 2000; Vojdani *et al.* 2008), zumo de manzana (Steele *et al.* 1982; Cody *et al.* 1999), salsa mayonesa (Weagant *et al.* 1994; Erickson *et al.* 1995; Raghubeer *et al.* 1995), frutos secos (CDC, 2011b), salami (CDC, 1995a, MacDonald *et al.* 2004; Conedera *et al.* 2007) y otros embutidos fermentados (Sartz *et al.* 2008). También leche cruda de vaca (Martin *et al.* 1986; Borczyk *et al.* 1987; Chapman *et al.* 1993; Keene *et al.* 1997a; Liptakova *et al.* 2004; Denny *et al.* 2008; Mohammadi *et al.* 2013) y de cabra (Bielaszewska *et al.* 1997; McIntyre *et al.* 2002) e incluso leche pasteurizada (Upton y Coia, 1994; Goh *et al.* 2002), queso (Arocha *et al.* 1992; Honish *et al.* 2005; Espié *et al.* 2006), cuajada (CDC, 2000a), yogurt (Morgan *et al.* 1993) o helados (Djuretic *et al.* 1997; De Schrijver *et al.* 2008). Además, el consumo de carne de ciervo también se asoció con infecciones humanas por el ECVT O157 en Japón y EE.UU. Del mismo modo, en el primer brote por carne de cerdo ocurrido en Canadá, se vió implicado un ECVT O157. De las 29 personas afectadas con problemas gastrointestinales, 6 sufrieron diarrea sanguinolenta y 7 tuvieron que ser hospitalizadas (Trotz-Williams *et al.* 2012).

Tabla 10. Fuentes implicadas en brotes en EE.UU. (1982-1994). Fuente López, 2006

Fuente	Brotos
Carne picada	22 (32%)
Persona-persona	9 (13%)
Vegetales (hortalizas y ensaladas)	4 (6%)
Agua de baño o bebida	3 (4%)
Carne asada	2 (3%)
Leche no pasterizada	2 (3%)
Sidra de manzana	2 (3%)
Desconocido	19 (28%)

La fuente más probable de contaminación cruzada para estos alimentos es el contacto con carne o heces (rumiantes o humanas) portadoras de ECVT. También se han producido brotes a través de agua de bebida (Geldreich *et al.* 1992; Olsen *et al.* 2002; Bopp *et al.* 2003; Heiman *et al.* 2015) o de baño (Hildebrand *et al.* 1996; Friedman *et al.* 1999; Paunio *et al.* 1999; Bruce *et al.* 2003; Bruneau *et al.* 2004; Verma *et al.* 2007). Es muy importante tener en cuenta que en el medio ambiente, tanto las heces bovinas como el suelo, pueden permanecer infectivos durante varios meses y que además, las rutas acuáticas son una forma de diseminación del ECVT O157 (Maule, 1999; García-Aljaro *et al.* 2005).

La mayoría de los estudios efectuados sobre la presencia de *E. coli* patógenos en alimentos se han centrado en los ECVT, y especialmente en los pertenecientes al serotipo O157:H7. Los ECVT se han detectado con prevalencias variables en distintos tipos de carne: entre el 0% y el 32% de las muestras de carne de vacuno, entre el 17% y el 63% de las de carne de ovino, entre el 4% y el 50% de las de carne de porcino y entre el 0% y el 12% de las de carne de pollo (Doyle y Schoeni, 1987; Read *et al.* 1990; Pièrard *et al.* 1997b; Heuvelink *et al.* 1999b; Tarr *et al.* 1999; Chapman *et al.* 2000b; Elder *et al.* 2000; Chinen *et al.* 2001; Coia *et al.* 2001; Arthur *et al.* 2002; Barkocy-Gallagher *et al.* 2003; Conedera *et al.* 2004; Drysdale *et al.* 2004; Chinen *et al.* 2009). En casi todos los estudios se ha encontrado una enorme variedad de serotipos, incluidos los que tienen más importancia como patógenos para seres humanos: O26:H11, O91:HNM, O111:HNM, O113:H21, O128:H2 y O157:H7 (Read *et al.* 1990; Sekla *et al.* 1990; Smith *et al.* 1991; Willshaw *et al.* 1993; Samadpour *et al.* 1994; Parma *et al.* 2000).

En el LREC en 1998 y 1999 se examinaron 387 muestras de canales de carne procedentes de mataderos del País Vasco y Navarra para la presencia del ECVT O157. Las cepas O157:H7 se encontraron en el 7% (12/167) de las examinadas en 1998 y en el 0,5% (1/220) de las analizadas en 1999 (Blanco *et al.* 2001).

Entre los años 1995 y 2009, en el LREC se analizó la presencia de ECVT en 1.465 muestras de carne de vacuno adquiridas en carnicerías de la ciudad de Lugo. Se detectaron ECVT en 153 (10%) muestras, 8 contaminadas (0,5%) con ECVT O157 y 148 (10,1%) con ECVT no O157. En 3 muestras se encontraron tanto ECVT O157 como no O157. La mayoría de las cepas de ECVT aisladas en carne de vacuno en Lugo (1995-2009) presentaron serotipos previamente encontrados en cepas ECVT aisladas de infecciones en humanos y un porcentaje significativo pertenecían a serotipos asociados con cepas causantes de SUH. Entre los serotipos detectados, por su importancia clínica, destacan: O26:H11, O103:H2, O145:HNM, O146:H21 y O157:H7 (Blanco *et al.* 1996b, 1996d; Mora, 2002; Román, 2002; Blanco *et al.* 2003; Mora *et al.* 2003, 2007a, 2011; Núñez, 2003; López, 2004; Herrera, 2005, 2008, 2010; Justel, 2005; Losada, 2005; García, 2009; Fernández, 2010).

En este estudio se observó que la detección de ECVT O157 era nula desde el año 2005 y que la prevalencia de los ECVT no O157 descendía progresivamente desde el año 2003 hasta situarse en el 4% en 2009. Sin embargo, esta prevalencia seguía siendo muy alta y apuntaba a la necesidad de mejorar la higiene, el control y la vigilancia de la cadena alimentaria (Figura 6 y Tabla 11).

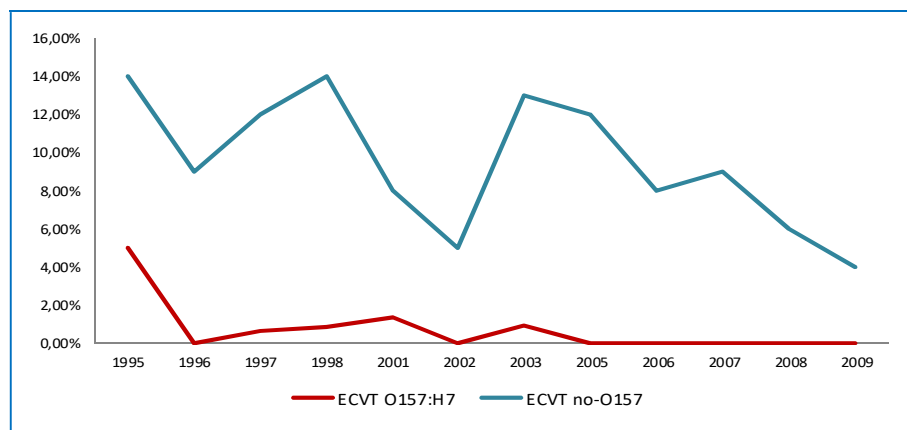


Figura 6. Evolución en la detección de ECVT en carne picada de vacuno fresca en la ciudad de Lugo (1995-2009). Fuente: Herrera, 2010

Tabla 11. Detección de ECVT O157 y no O157 en carne fresca de vacuno en Lugo (1995-2009). Fuente: Herrera, 2015

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

En Europa, durante los años 2004-2010, 14 estados miembros de la UE analizaron muestras de frutas, vegetales y otros productos de origen vegetal. De un total de 6.285 muestras, 18 fueron positivas para ECVT (0,3%), y 10 de esas se confirmaron como ECVT O157 (0,2%). Prácticamente todos los positivos registrados fueron vegetales, con el 0,7% de las muestras analizadas positivas para ECVT (Tabla 12) (EFSA, 2011a, EFSA/ECDC, 2012).

Tabla 12. Detección de ECVT en frutas, vegetales y otros productos de origen vegetal, reportados por estados miembros de la UE (2004-2010) (EFSA, 2011a; EFSA/ECDC, 2012)

Producto agrícola	N°	ECVT		O157	
Frutas y hortalizas	3.465	1	(0,03%)	0	(0%)
Vegetales	2.394	17	(0,7%)	10	(0,4%)
Zumos	317	0	(0%)	0	(0%)
Brotos	104	0	(0%)	0	(0%)
Espicias y hierbas	3	0	(0%)	0	(0%)
Ensaladas listas para el consumo	2	0	(0%)	0	(0%)
TOTAL	6.285	18	(0,3%)	10	(0,2%)

1.6.4. ECVT O104: el brote alemán

Dentro del grupo de los ECVT no O157 cabe destacar el serogrupo O104, que adquirió gran relevancia a consecuencia del brote ocurrido en Alemania en 2011. A principios de mayo de aquel año *E. coli* O104:H4 fue el causante de un brote de SUH y diarrea sanguinolenta que se extendió por Alemania (Bielaszewska *et al.* 2011a). El brote alcanzó su punto álgido (tanto en casos de SUH como de gastroenteritis) entre los días 21 y 22 de mayo (Figura 7).

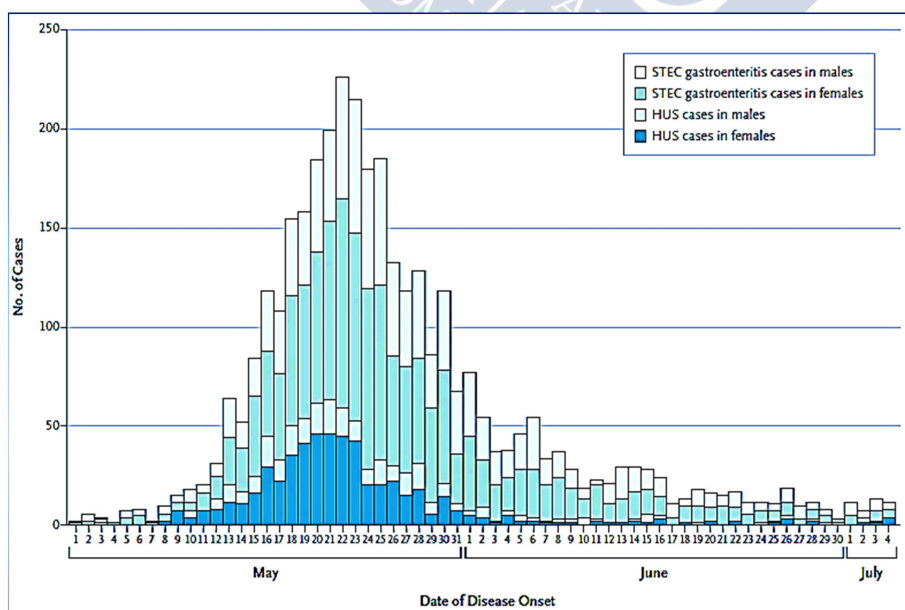


Figura 7. Curva epidemiológica del brote. Fuente: Frank *et al.* 2011

En total se reportaron 3.816 casos de infección en seres humanos, 845 (22%) personas desarrollaron SUH y 36 de ellas fallecieron (4,2%). Al resto de los casos, 2.971, se les diagnosticó gastroenteritis y fallecieron 18 de ellos (0,6%). En total perdieron la vida 54 personas (Frank *et al.* 2011). Según los datos del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDPC) en otros 13 países de la Unión Europea se produjeron 49 casos de SUH y 76 casos de diarrea/CH, incluidos 9 casos de SUH de un brote en Francia (Gault *et al.* 2011) y 2 casos esporádicos en España. Además, también se detectaron algunos casos en EE.UU. y Canadá en pacientes que habían visitado Alemania (ECDPC y EFSA, 2011; Frank *et al.* 2011; Robert Koch Institute, 2011; Devaux *et al.* 2015).

La cepa hipervirulenta causante de los brotes de Alemania y Francia era una cepa atípica en muchos aspectos (Blanco, 2012):

- Cepa híbrida de 2 patotipos, a la vez enteroagregativa y productora de la toxina *Shiga* del subtipo VT2a. La combinación de genes de virulencia de estos patotipos no es frecuente, y previamente solo se había observado en una cepa del serotipo O111:H2 responsable de un pequeño brote en niños con SUH ocurrido en Francia (Morabito *et al.* 1998) y en una cepa O111:H21 productora de VT2c responsable de un pequeño brote familiar con SUH en el Reino Unido en 2012 (Dallman *et al.* 2012).
- Serotipo (O104:H4), muy raramente detectado hasta la fecha en cepas aisladas de pacientes humanos, y nunca observado en cepas aisladas de animales ni de alimentos (Bielaszewska *et al.* 2011a; Scheutz *et al.* 2011). Existen referencias de este serotipo en cepas ECVT aisladas en Alemania en 2001 (Mellman *et al.* 2008a), en Francia en 2004 (Scheutz *et al.* 2011), en Corea en 2005 (Bae *et al.* 2006; Kim *et al.* 2011), en la República de Georgia y en Italia en 2009 (Scheutz *et al.* 2011; Scavia *et al.* 2011) y en Finlandia en 2010 (Scheutz *et al.* 2011). Las cepas de Alemania, República de Georgia, Italia y Finlandia también eran enteroagregativas y productoras de VT2a. La cepa de Corea no era enteroagregativa y producía VT1 y VT2. También se aislaron cepas enteroagregativas del serotipo O104:H4, pero no productoras de toxinas *Shiga*, en la República Centrafricana (1995/1996) (Bielaszewska *et al.* 2011a), en Dinamarca (2000) (Scheutz *et al.* 2011), en España (1996) (datos no publicados) y recientemente en la República de Malí (2009) (Scheutz *et al.* 2011).
- Carente de la isla de patogenicidad LEE, portadora del gen *eae* que está presente en las cepas ECVT más virulentas de los seropatotipos A y B (Bielaszewska *et al.* 2011a).
- Multirresistente, productora de la beta-lactamasa de espectro extendido CTX-M-15, asociada actualmente su diseminación al grupo clonal ST131 (Bielaszewska *et al.* 2011a).

- Perteneciente a una secuencia tipo rara (ST678). En los últimos 15 años, solo se ha descrito una cepa de *E. coli* O104:H4 ST678 aislada de un paciente con SUH en Alemania (Mellmann *et al.* 2008a).
- Con un tiempo medio de incubación estimado en 8 días, más largo que los 3-4 días de período medio de incubación reportado para ECVT O157 (Bell *et al.* 1994; Mead y Griffin, 1998).
- Además de genes de virulencia de ECVT y ECEAgg, la cepa del brote presentaba factores de virulencia asociados al linaje de los *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) (Bielaszewska *et al.* 2011a; Rasko *et al.* 2011).

Todos estos datos sugirieron la aparición de un nuevo patotipo de *E. coli* procedente de 2 ancestros, ECEH y ECEAgg. Se especuló con la idea de que el brote fuera causado por una típica cepa de un *E. coli* enteroagregativo que hubiese adquirido el bacteriófago codificante para la verotoxina VT2a (Scheutz *et al.* 2011). Todos los datos parecen indicar que sería una de las miles de cepas que emergen continuamente como consecuencia de la transferencia genética horizontal, junto con eventos de delección, seleccionada por la presión antibiótica. El brote ocurrido en Alemania puso de manifiesto la capacidad de especies como *E. coli* de generar nuevas combinaciones de genes que conducen a la emergencia de cepas altamente patógenas, que además pueden ser resistentes a los antibióticos de mayor utilidad clínica (Rasko *et al.* 2011).

Según los estudios epidemiológicos llevados a cabo por el *Robert Kock Institute* parece que las causas del brote fueron unos brotes de soja. Hasta la fecha, hay importantes diferencias entre este brote y otros grandes brotes de ECVT (Fukushima *et al.* 1999; Wendel *et al.* 2009), tales como el ocurrido en Japón en 1996 en el que hubo 121 casos de SUH, todos en niños (Fukushima *et al.* 1999). La primera diferencia que podemos observar es que el SUH supuso la cuarta parte de los casos, lo que es un porcentaje mucho mayor que en otros brotes; en segundo lugar, la mayoría de los casos de SUH (aproximadamente el 89%) ocurrió en adultos y no en niños, la mayoría eran mujeres; y, en tercer lugar, el agente causante es un ECVT no O157 del serotipo O104:H4.

1.6.5. ECVT: situación en España

En España, los ECVT han provocado al menos 17 brotes desde 1986 (Tabla 13): 14 han sido causados por ECVT O157 (principalmente del fagotipo 2) y 3 por ECVT de los serotipos O26:H11 (Mora *et al.* 2004) y O111:HNM (Blanco *et al.* 1996c). En un estudio realizado por Byrne y colaboradores (2015) se analizaron 3.717 casos de infección por ECVT ocurridos entre 2009 y 2012, de los cuales 91 estaban asociados a turistas que habían visitado España, siendo el tercer país más frecuentemente implicado entre los casos asociados a viajes (Byrne *et al.* 2015).

Tabla 13. Principales brotes causados por ECVT en España. Fuente: Herrera, 2015

Lugar (Referencia)	Año	Afectados Situación	Serotipos Verotoxinas Fagotipos	Nº Afectados
Ibiza (Smith <i>et al.</i> 1987)	1986	Turistas británicos en un hotel	O157:H7 VT2	3 (+3asintomáticos)
Islas Baleares (Willshaw <i>et al.</i> 1996)	1994	Turistas británicos	O157:H7 VT2 Fagotipo 2	Dato no disponible
Álava (Blanco <i>et al.</i> 1996c)	1995	Chicos en una casa de campo	O111:HNM VT1	13
Madrid (Soler Crespo <i>et al.</i> 1999)	1996	Familiar	O157:H7	3
Las Palmas (Soler Crespo <i>et al.</i> 1999)	1997	Turistas en urbanización	O157:H7	11 (3 con SHU)
Fuerteventura (Pebody <i>et al.</i> 1999)	1997	Turistas europeos en cuatro hoteles	O157:H7 VT2 Fagotipo 2	14 (3 con SHU)
Guipúzcoa (Gomariz <i>et al.</i> 2000)	1999	Niños de una guardería	O157:H7	8 (1 con SHU) (+6 asintomáticos)
Guipúzcoa (Gomariz <i>et al.</i> 2000)	1999	Dato no disponible	O157:H7	2 (1 con SHU) (+2 asintomáticos)
Valencia (Soler Crespo <i>et al.</i> 1999)	1999	Turistas en urbanización	O157:H7	4 (3 con SHU)
Barcelona (Anónimo 2001) (Muniesa <i>et al.</i> 2003)	2000	Niños de tres Colegios	O157:H7 VT2 Fagotipo 2	175 (6 con SHU)
Lugo (Blanco <i>et al.</i> 2004d)	2003	Brote familiar	O157:H7 VT1 VT2 Fagotipo 8	3
Lugo (Blanco <i>et al.</i> 2004d)	2003	Brote familiar	O26:H11 VT1	4
Cáceres (Martínez <i>et al.</i> 2010)	2007	Dato no disponible	O157:H7 VT1 VT2 Fagotipo 14	3
Sin especificar (Instituto de salud Carlos III, 2013a)	2010	Sin especificar	O157:H7	48 (sin especificar)
Sin especificar (Instituto de salud Carlos III, 2013b)	2011	Sin especificar	O157:H7	Sin especificar
Sin especificar (Instituto de salud Carlos III, 2015)	2012	Sin especificar	O157	8 (sin especificar)
Sin especificar (Instituto de salud Carlos III, 2015)	2012	Sin especificar	O111	2 (sin especificar)

En colaboración con la Unidad de Microbiología Clínica del Hospital Lucus Augusti de Lugo (HULA), el LREC realizó un amplio estudio epidemiológico con el objetivo prioritario de evaluar el papel de los ECVT como patógenos entéricos en nuestra área sanitaria. Entre 1992 y 2013 se procesaron un total de 18.745 coprocultivos para la presencia de ECVT O157 y no O157 (Tabla 14 y Figura 8). Procedían de pacientes internos y externos de todas las edades que en su mayoría presentaban diarrea o gastroenteritis. Aproximadamente el 75% eran casos agudos que requirieron hospitalización. Los ECVT se detectaron en 517 (2,8%) de los 18.745 coprocultivos examinados. En total se confirmaron 71 (0,4%) casos de infección por ECVT O157 y 349 (1,9%) por ECVT no O157. Se observó un incremento de casos positivos de ECVT desde el año 1992 (0%) hasta el año 2003 (6,6%), para producirse una disminución hasta el año 2013 (2%). Entre los serogrupos de ECVT no O157 más frecuentemente detectados en las cepas de ECVT en el HULA se encuentran el O5, O26, O64, O69, O75, O103, O111, O139, O118, O145 y O146. (Mora *et al.* 2011, datos LREC sin publicar).

Tabla 14. Prevalencia de ECVT en coprocultivos de pacientes del HULA (1992-2013)

Año	Nº de coprocultivos						
	Total analizados	ECVT					
		O157:H7 Aislados		No-O157 Aislados		Total Detectados	
1992	186	0	0%	0	0%	0	0%
1993	439	0	0%	4	0,9%	4	0,9%
1994	510	0	0%	7	1,4%	7	1,4%
1995	707	3	0,4%	7	1,0%	10	1,4%
1996	684	1	0,1%	8	1,2%	9	1,3%
1997	850	7	0,8%	17	2,0%	26	3,0%
1998	1048	4	0,4%	27	2,6%	42	4,0%
1999	630	9	1,4%	17	2,7%	28	4,4%
92-99	5054	24	0,5%	87	1,7%	126	2,5%
2003	834	8	0,9%	20	2,4%	55	6,6%
2004	1459	3	0,2	28	1,9%	48	3,3%
2005	1685	1	0,1%	27	1,6%	41	2,4%
03-05	3970	12	0,3%	75	1,9%	144	3,6%
2006	1737	12	0,7%	25	1,4%	40	2,3%
2007	1802	10	0,55%	39	2,2%	50	2,8%
2008	611	4	0,65%	13	2,1%	18	2,9%
2009	313	0	0%	5	1,6%	5	1,6%
2010	229	1	0,4%	3	1,3%	6	2,6%
06-10	4692	27	0,6%	85	1,8%	119	2,5%
2011	998	2	0,2%	24	2,4%	27	2,7%
2012	1883	5	0,3%	46	2,4%	57	3%
2013	2148	1	0,05%	32	1,5%	44	2%
11-13	5029	8	0,2%	102	2%	128	2,5%

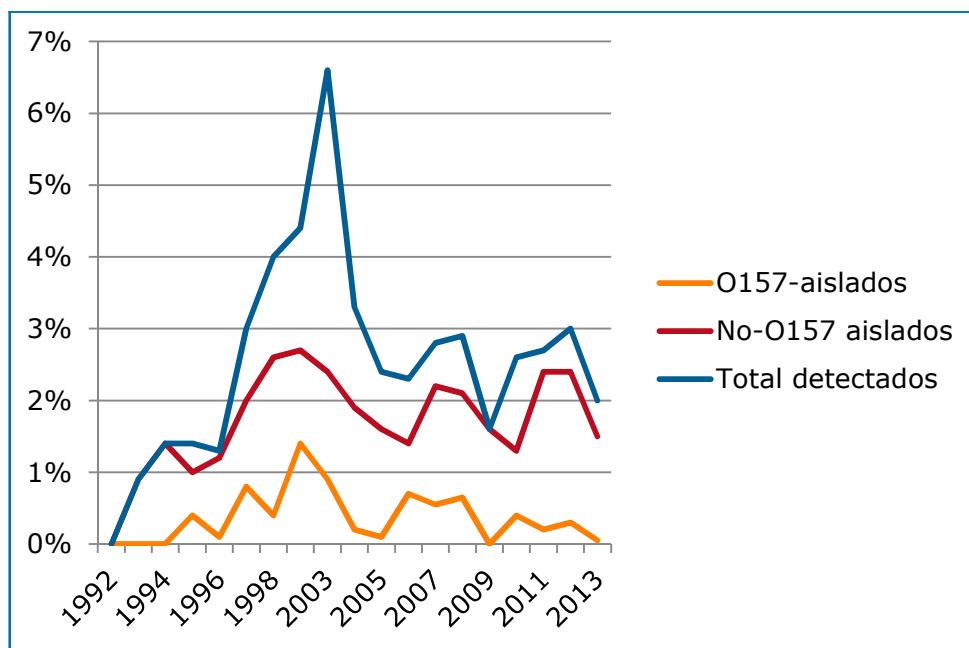


Figura 8. Evolución de la detección de ECVT y aislamiento de cepas ECVT O157 y no O157 aisladas de coprocultivos de pacientes del HULA (1992-2013)

Los datos obtenidos en el LREC entre los años 2010 a 2013, indican que las cepas de ECVT aisladas en hospitales de toda Galicia pertenecen a un amplio número de serogrupos (Tabla 15), con un 60% (95/159) pertenecientes a serogrupos de alto riesgo (Tabla 16) y el 72% (114/159) portadoras del gen *eae* (datos LREC sin publicar).

Tabla 15. Serogrupos de 159 cepas de ECVT aisladas en hospitales de Galicia (2010-2013)

SERGRUPO	CEPAS LUGO	CEPAS SANTIAGO	OTROS HOSPITALES	TOTAL	vt1	vt2	vt1+vt2	eae
O157	10	9	12	31	0	16	15	31
O4	1	0	0	1	0	1	0	1
O5	2	0	0	2	2	0	0	1
O6	1	0	0	1	1	0	0	0
O8-141	0	1	0	1	0	0	1	0
O8	2	0	0	2	1	1	0	0
O9	2	0	0	2	0	2	0	1
O25	1	0	0	1	0	1	0	1
O26	25	6	2	33	33	0	0	33
O54	0	1	0	1	0	1	0	0
O55	1	0	0	1	1	0	0	0
O64	1	0	0	1	0	1	0	0
O68	1	1	0	2	2	0	0	1
O69	1	0	0	1	0	0	1	1
O76	1	0	0	1	1	0	0	0
O76-O169	1	0	0	1	1	0	0	0
O88	1	0	0	1	1	0	0	0
O91	1	0	0	1	0	0	1	0
O103	1	0	0	1	1	0	0	1
O104	0	1	0	1	0	1	0	0
O111	19	4	0	23	8	4	11	23
O113	3	0	0	3	0	2	1	0
O123	1	0	0	1	1	0	0	0
O128	1	0	0	1	0	0	1	0
O130	1	0	0	1	0	0	1	0
O145	5	2	0	7	1	6	0	7
O146	6	1	0	7	0	0	7	2
O148	3	0	0	3	0	3	0	0
O150	1	0	0	1	0	1	0	0
O156	1	1	0	2	2	0	0	2
O166	1	0	0	1	0	0	1	0
O174	3	0	0	3	0	1	2	0
O177	1	0	0	1	0	1	0	1
O185	1	0	0	1	0	1	0	0
ONT	12	3	0	15	6	8	1	7
No realizado	3	0	0	3	3	0	0	1
TOTAL	115	30	14	159	65	51	43	114

En rojo se señalan los serogrupos considerados de alto riesgo. El 60% (95/159) pertenecen a dichos serogrupos

Tabla 16. Cepas ECVT de serogrupos de alto riesgo aisladas de pacientes en Galicia

SEROGRUPO	2010	2011	2012	2013	2010-2013
O26	2 (17%)	11 (48%)	12 (35%)	8 (30%)	33 (34%)
O103	0	0	1 (3%)	0	1 (1%)
O111	3 (25%)	6 (26%)	9 (26%)	5 (18%)	23 (24%)
O145	0	1 (4%)	4 (12%)	2 (7%)	7 (7%)
O157	7 (58%)	5 (22%)	8 (24%)	11 (41%)	31 (32%)
TOTAL	12	23	34	27	96

Por lo tanto, los resultados del LREC indican que los ECVT son una causa significativa de infecciones en humanos en nuestra área sanitaria y confirmarían lo reportado en relación a que en Europa continental las infecciones por ECVT no O157 son mucho más frecuentes que las causadas por ECVT del serotipo O157:H7 (Mora 2002; Blanco *et al.* 2003a, 2004a).

Otro grupo español (Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres), en colaboración con la Unidad de Microbiología del Hospital San Pedro de Alcántara de Cáceres, realizó un estudio epidemiológico en el que se procesaron un total de 1.675 coprocultivos para detectar la presencia de ECVT O157. Estos coprocultivos procedían de pacientes internos y externos de todas las edades aquejados de procesos gastroentéricos, entre los meses de junio de 2006 y diciembre de 2007. El ECVT O157 se aisló en 8 coprocultivos (0,5%) pero además, en el contexto de este trabajo, se detectó uno de los brotes de infección por ECVT O157 ocurrido en España (Martínez *et al.* 2010).

1.6.6. Caracterización y tipado de ECVT

Los métodos de tipado pueden dividirse de forma genérica en 2 grandes grupos: *fenotípicos* (basados en propiedades manifestadas, como son los antígenos somáticos O y flagelares H, la susceptibilidad a los bacteriófagos o fagotipado, resistencia a los antimicrobianos, actividad enzimática) y *genotípicos* (basados en características moleculares específicas del ADN cromosómico, plasmídico o de fagos) (Strockbine *et al.* 1998; Akiba *et al.* 1999; Iyoda *et al.* 1999; Louie *et al.* 1999; Zhao *et al.* 2000; Thomson-Carter, 2001; Foley *et al.* 2004).

1.6.6.1. Métodos fenotípicos

1.6.6.1.1. Serotipado

El serotipado constituye una herramienta de gran valor para la clasificación intraespecífica de las distintas cepas de *E. coli*, como base para llevar a cabo análisis

epidemiológicos. A raíz de las primeras evidencias surgidas en 1945-1950 de que ciertos tipos serológicos de *E. coli* se asociaban con epidemias de enteritis, y tras la publicación de una serie de trabajos pioneros (Kauffmann, 1947; Orskov y Orskov, 1984), quedó establecido que *E. coli* expresa 3 antígenos superficiales principales. El serotipado está basado en la identificación de estos 3 antígenos: somáticos “O”, capsulares “K” y flagelares “H” (Guinée *et al.* 1972, 1981; Orskov *et al.* 1977; Orskov y Orskov 1984; Wang *et al.* 2003; Feng *et al.* 2004).

El serotipado, junto con posteriores tipificaciones, ha demostrado ser muy útil a la hora de caracterizar las cepas patógenas, y en concreto a la hora de evaluar el papel de los ECVT no O157 (Bockemühl *et al.* 1992; Caprioli *et al.* 1997; Beutin *et al.* 1998; Fey *et al.* 2000; Blanco *et al.* 2004d; Mora *et al.* 2005; Rivas *et al.* 2006a). Los resultados del serotipado en diferentes laboratorios demostraron que los ECVT asociados con enfermedades humanas pertenecían a una amplia variedad de serotipos (Bockemühl *et al.* 1992; Willshaw *et al.* 1992, 1997; Beutin *et al.* 1998). Hasta la fecha se han descrito cerca de 500 combinaciones o serotipos O:H diferentes entre los ECVT causantes de infecciones en seres humanos. Un mayor desarrollo del sistema de serotipado conduce a la identificación de nuevos serotipos de ECVT (Blanco *et al.* 2004c; Zweifel *et al.* 2005; Much *et al.* 2009).

La complejidad de las técnicas básicas para la determinación de los antígenos O y H, y el hecho de que muy pocos laboratorios disponen de todos los antisueros necesarios para ello, ha llevado a que en los últimos años se hayan desarrollado pruebas moleculares específicas, tales como PCR (reacción en cadena de la polimerasa, *polimerase chain reaction*) o *microarrays*, para detectar e identificar los antígenos O y H más comunes en las cepas asociadas a las infecciones más graves (Wang *et al.* 2010; Debroy *et al.* 2011). Actualmente, en base a la secuenciación genómica completa, se han desarrollado herramientas para el análisis *in silico* de predicción del serotipo (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>).

1.6.6.1.2. Fagotipado

El fagotipado es otro método fenotípico de subtipado de los ECVT, inicialmente desarrollado para cepas del ECVT O157, consistente en la clasificación de una cepa en función de su respuesta lítica a un determinado número de bacteriófagos. El esquema de fagotipado fue desarrollado en Canadá (Ahmed *et al.* 1987). Después de las sucesivas ampliaciones del esquema original (Khakhria *et al.* 1990; Ahmed *et al.* 2001), el esquema actual utiliza 16 fagos y hasta ahora identifica hasta unos 90 fagotipos (Mora *et al.* 2007a, 2007b).

El fagotipado ha resultado ser útil en muchos estudios epidemiológicos. Sin embargo, la mayoría de las cepas aisladas en un país pertenecen a un pequeño número de fagotipos, siendo necesario, por ello, emplear además otras técnicas de epidemiología molecular. Por este motivo el fagotipado se ha utilizado ampliamente como complemento de la técnica de PFGE

(Barret *et al.* 1994; Bonardi *et al.* 2001; Chinen *et al.* 2001; Mora *et al.* 2004, 2007b; Eklund *et al.* 2006; Alonso *et al.* 2007; Leotta *et al.* 2008; Tóth *et al.* 2009; Aspán y Eriksson 2010).

Cheasty y colaboradores (2000) fagotiparon miles de cepas del ECVT O157 aisladas de seres humanos en 13 países europeos. Los fagotipos predominantes entre las cepas humanas del ECVT O157 en Europa fueron: 2, 4, 8, 14, 21/28 y 32. Las cepas bovinas y ovinas presentan fagotipos similares a los encontrados en las cepas humanas. No obstante, se han encontrado diferencias en la prevalencias de los distintos fagotipos dependiendo de la región geográfica y a lo largo de los años (Khakhria *et al.* 1990; Synge 1999; Ahmed *et al.* 2001; Allison *et al.* 2000; Nishikawa *et al.* 2001).

Entre las cepas del ECVT O157 aisladas por nuestro grupo en España entre los años 1980 y 1999 se detectaron un total de 18 fagotipos: 2, 4, 8, 14, 21/28, 23, 26, 27, 31, 32, 34, 39, 45, 50, 51, 54, 63 y 87. No obstante, el 68% (116 cepas) se pudieron englobar en tan solo 5 fagotipos: 2 (42 cepas), 8 (33 cepas), 14 (14 cepas), 21/28 (11 cepas) y 54 (16 cepas). Los fagotipos 2 y 8 fueron los más frecuentes, tanto entre las cepas humanas como bovinas, representando el 51% (34/67) y el 46% (38/82) de dichas cepas, respectivamente. Entre las cepas ovinas predominaron los fagotipos 54 (5/12) y 14 (3/12). Las 10 cepas aisladas de carne de vacuno en España pertenecieron a los fagotipos 2, 4, 8, 21/28, 32 (Tabla 17). El fagotipo 2 se encontró frecuentemente tanto entre las cepas humanas aisladas en Lugo como en otras partes de España, mientras que las cepas del fagotipo 8 se detectaron especialmente en Lugo. Al relacionar los fagotipos de las cepas con la clínica de los pacientes se observó que las cepas de los fagotipos 2 y 14 se asociaban normalmente con patologías agudas (Mora *et al.* 2004).

Tabla 17. Fagotipos determinados en cepas del ECVT O157 de origen humano y animal aisladas en España (1980-1999). Adaptada de López, 2006

Fagotipo	ORIGEN DE AISLAMIENTO				Total (n=171)
	Humano (n=67)	Bovino (n=82)	Carne- vacuno (n=10)	Ovino (n=12)	
2	19	21	2	0	42
4	1	0	1	0	2
8	15	17	1	0	33
14	7	4	0	3	14
21/28	1	7	3	0	11
23	0	4	0	0	4
26	1	1	0	0	2
27	0	1	0	0	1
31	2	0	0	0	2
32	0	1	1	0	2
34	1	3	0	2	6
39	3	2	0	0	5
45	0	2	0	0	2
50	1	0	0	0	1
51	0	1	0	0	1
54	3	8	0	5	16
63	1	1	0	0	2
87	1	0	0	0	1
Atípico	11	9	2	2	24

Por lo tanto, la distribución de fagotipos detectada en las cepas del ECVT O157 de origen humano y animal en España es muy similar a la encontrada en la mayoría de los estudios realizados en Europa. Conviene resaltar que tanto en España como en otros países, los fagotipos predominantes entre las cepas de origen bovino son también los más comunes entre las cepas aisladas de seres humanos, lo que confirma al ganado bovino como el principal reservorio (Mora *et al.* 2004).

Aunque esta técnica se ha empleado principalmente en cepas ECVT O157, también se ha utilizado esta técnica en el subtipado de cepas ECVT no O157 de los serotipos O103:H2 y O103:HNM (Prager *et al.* 2002).

1.6.6.2. Tipado molecular

La epidemiología molecular es en gran parte descriptiva y caracteriza las bacterias en función de su variación genética natural. Se han empleado una serie de métodos moleculares para determinar esta variación, que puede ser debida a mutaciones o a transferencia horizontal de genes. Básicamente se pueden distinguir 2 ramas de la epidemiología molecular: clasificación y tipificación. La clasificación puede ilustrar relaciones evolutivas y subdivide las especies en grupos clonales, mientras que la tipificación se utiliza más a menudo para la diferenciación de los aislados clínicos o ambientales. La epidemiología a largo plazo puede requerir la clasificación, mientras que la epidemiología local a corto plazo utiliza más a menudo métodos de tipado. Mientras que los métodos más importantes para la clasificación molecular son MLST y MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) (Caugant *et al.* 1986; Maiden *et al.* 1998), la técnica de PFGE o los métodos basados en PCR, tales como ADN polimórfico amplificado por PCR, AFLP, o la caracterización de genes de virulencia, se han utilizado con frecuencia para la tipificación.

La técnica de PFGE es muy útil para detectar grupos de cepas que probablemente han evolucionado muy poco y que por lo tanto no son detectables por MLST, e indica las diferencias que se han desarrollado más lentamente por mutación y recombinación. Por otro lado, el tipado mediante PFGE por sí solo no es suficiente para definir grupos de cepas que están filogenéticamente relacionados. La combinación de MLST, PFGE, y la tipificación de genes de virulencia permite clasificar las cepas en grupos que no solo difieren en sus genes de virulencia sino que también representan distintos linajes con perfiles de MLST diferentes (Beutin *et al.* 2005a).

La comparación de secuencias del genoma de cepas de los serogrupos O26, O103, O111 y O157 reveló altas similitudes en sus genes y otros factores específicos para el patotipo de ECVT. Sin embargo, la adquisición independiente de elementos genéticos móviles, tales como islas de patogenicidad (PAIS), bacteriófagos y plásmidos a través de transferencia horizontal de genes, ha sido identificada como la principal fuerza impulsora para una evolución paralela que lleva a diferentes filogenias de ECVT (Ogura *et al.* 2009). Los análisis filogenéticos de varios estudios sugieren antepasados compartidos o linajes comunes a partir de los cuales los diferentes serotipos han evolucionado. Por ejemplo, en el serotipo O103:H11 se encontraron aislamientos que podrían tener el mismo ancestro que EHEC O26:H11 cuando se analizaron variantes de 2 genes (*fliC* y *eae*) (Iguchi *et al.* 2012). Además, dado que O26:H11 y O111:H11 portan perfiles de virulencia muy similares, se sugirió que hay cepas H11 que están estrechamente relacionadas (Ju *et al.* 2014). Por otra parte, los análisis del genoma completo de 2 cepas ECVT O145 mostraron que tenían un ancestro común con EPEC O157:H7 antes de que evolucionaran aún más en otro sublinaje (Cooper *et al.* 2014).

Otro hecho que hace alusión a una filogenia más compleja que la distribución por serogrupos de las cepas de ECVT, es el frecuente aislamiento de cepas ECEPa con los mismos serogrupos no O157 que cepas de ECVT (Bokete *et al.* 1997; Eklund *et al.* 2006). Las cepas ECEPa no albergan el bacteriófago VT pero son similares a las cepas de EHEC capaces de la formación de la lesión A/E causada por LEE. Se cree que las cepas ECEPa pueden haber evolucionado durante la infección humana por pérdida del gen *vt*, y por lo tanto se designaron como ECEH-LST (ECEH que perdió VT) (Bielaszewska *et al.* 2007b) aunque podrían revertir de nuevo a ECVT con la adquisición de los genes *vt* (Bielaszewska *et al.* 2007b; Mellmann *et al.* 2008b).

La nomenclatura común de los aislados de *E. coli* en diferentes serogrupos O se cree que implica una relación genética distante de estas cepas. Por lo tanto, un serogrupo O también podría sugerir una filogenia individual de este linaje con diferencias en sus características biológicas. La divergencia de los genes de los antígenos O111 y O26 podría ser debido a la transferencia de genes de la región *rfb*, lo que también causó la evolución de O157:H7 a partir del antepasado común, O55:H7 (Feng *et al.* 1998). Comparables eventos de recombinación de las regiones codificantes del antígeno O podrían ser responsables de la evolución de cepas ECVT y ECEPa de los serogrupos O26 y O111 a partir de un ancestro común, lo que explica las diferencias en el antígeno somático.

Por el contrario, los análisis filogenéticos de los antígenos flagelares H fueron descritos como monofiléticos y revelaron una estrecha relación de cepas O111:H11 y O26:H11 (Ju *et al.* 2012). Esto condujo a la hipótesis de que O26:H11 evolucionara de una cepa ancestral O111:H11 por un cambio antigénico de O111 a O26 y en general de que las cepas ECVT con los mismos antígenos H podrían compartir un ancestro (Iguchi *et al.* 2012). Esto sugiere que la tipificación de los antígenos H da más información que el serogrupo O (Iguchi *et al.* 2012). Por lo tanto, el análisis basado en el serotipo O:H refleja la filogenia de *E. coli* más adecuadamente (Eichhorn *et al.* 2015).

Los sistemas de tipificación genética constituyen una de las aportaciones microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. Estos sistemas comprenden una gran variedad de técnicas que tienen por objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de 2 o más microorganismos. De este modo, se puede reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados de un microorganismo precursor común.

Estas técnicas moleculares son muy útiles a la hora de la identificación de brotes. Prueba de ello es el caso de un brote ocurrido en EE.UU. en el año 2000 debido al consumo de hamburguesas que solo fue significativo cuando se empleó la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE). Mediante la investigación por métodos tradicionales no se detectó

una probabilidad significativa, lo cual generó que se descartara el evento como un brote (Boric, 2008).

El tipado molecular también puede proporcionar información sobre la distribución de cepas de *E. coli* en poblaciones humanas y animales, lo que puede ser aplicado en programas de vigilancia a nivel local, regional, nacional o global. De especial interés puede ser el monitoreo de marcadores asociados con la patogenicidad, inmunidad o resistencia a antibióticos. Además, se pueden realizar análisis periódicos para la detección de grupos de *E. coli* patógenos con perfiles de genes de virulencia similares y con un origen común en espacio y tiempo para así poder mejorar las advertencias anticipadas de los servicios de salud e intervenciones preventivas, como el desarrollo de vacunas y los programas de inmunización.

Estas técnicas también pueden ser usadas en estudios clínicos para la identificación de patrones de colonización y de fuentes de transmisión de microorganismos infecciosos, lo cual puede contribuir a un entendimiento de la epidemiología y patogénesis, ayudando con ello al desarrollo de estrategias de prevención de enfermedades (Struelens y MESGEM, 1996).

Sin embargo, para lograr una aplicación práctica y rutinaria de estas técnicas en la detección e identificación de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos es necesario hacer un esfuerzo en la estandarización y normalización de estos métodos (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014).

Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencias del ARNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipado. En contraste con las características fisiológicas y bioquímicas, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión. Estos métodos moleculares se utilizan a menudo en asociación con la identificación microbiológica convencional (Ward y Roy, 2005; Foley y Grant, 2007).

1.6.6.2.1. Caracterización de genes de virulencia mediante PCR

La PCR es una técnica de biología molecular descrita por Saiki y colaboradores (1985) y Mullis y Faloona (1987) cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular (Figura 9). Tiene infinidad de aplicaciones, como la detección de genes o regiones diana de microorganismos patógenos. Asimismo, se emplea en la detección de enfermedades hereditarias, la identificación de huellas digitales genéticas, el diagnóstico clínico, el análisis forense del ADN y la investigación en biología molecular.

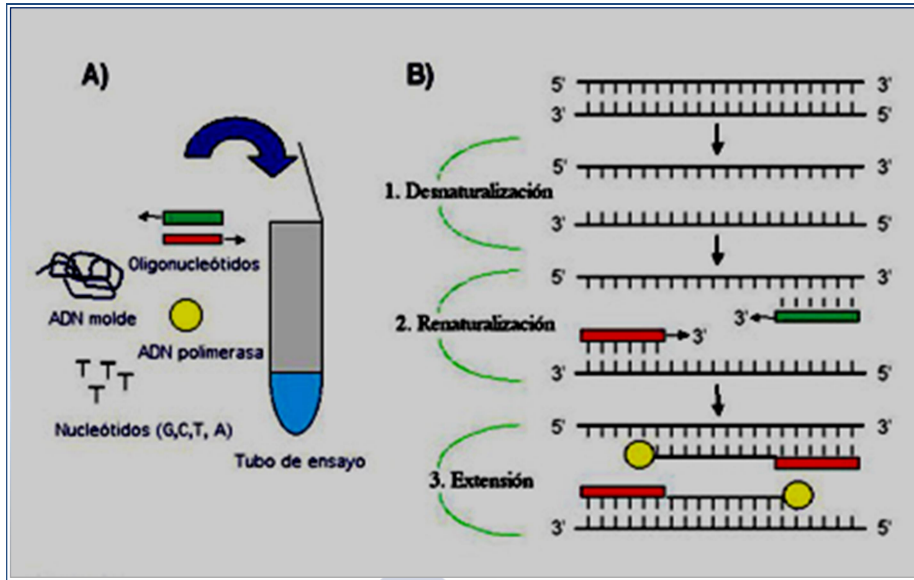


Figura 9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fuente: http://www.psiquiatria.com/congreso_old/mesas/mesa23/conferencias/23_ci_a.htm

Poco después de haberse descrito la técnica se pusieron a punto pruebas de PCR para detectar los genes *vtx* en *E. coli* (Pollard *et al.* 1990), de tal manera que hoy en día la PCR se considera un método sensible, rápido y versátil de subtipado de los *E. coli* patógenos, y de los ECVT en particular. La técnica de PCR se emplea para la detección de genes que codifican para diferentes factores y marcadores de virulencia de los ECVT como son: los genes *vt1* y *vt2* (Pollard *et al.* 1990), el gen *fliC* que codifica para el antígeno flagelar H7 (Gannon *et al.* 1997a; Wang *et al.* 2000; Johnson y Stell, 2001), el gen *rfb* que codifica para una enzima necesaria para la síntesis del lipopolisacárido O157 (Desmarchelier *et al.* 1998; Maurer *et al.* 1999; Paton y Paton, 1999), el antígeno O111 (Wang *et al.* 1998), el gen *eae* (Gannon *et al.* 1993; Paton y Paton, 2002; Blanco M *et al.* 2003a, 2004a, 2004c, 2005; Garrido *et al.* 2006; Mora *et al.* 2007a) y el gen *E-hlyA* que codifica para la enterohemolisina (Beutin *et al.* 1988, 1996a; Schmidt *et al.* 1995; Pièrard *et al.* 1997a,b; Liptakova *et al.* 2002; Paton y Paton, 2002; Cookson *et al.* 2007). Se puede realizar una PCR múltiple y detectar conjuntamente los genes de virulencia más importantes de los ECVT: *vt1*, *vt2*, *eae* y *E-hlyA* (Cebula *et al.* 1995; Fratamico *et al.* 1995; Gannon *et al.* 1997b; Franck *et al.* 1998; Louie *et al.* 1998; Nagano *et al.* 1998; Paton y Paton, 1998b, 2002; Fagan *et al.* 1999; Hu *et al.* 1999).

Actualmente se conocen del orden de un centenar de genes que se han relacionado con la virulencia de los ECVT, y se han desarrollado microarrays capaces de detectar gran número de ellos de forma conjunta en una sola prueba (Chizhikov *et al.* 2001; Bekal *et al.* 2003; Dobrindt *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005; Garrido *et al.* 2006; Geue *et al.* 2010).

La PCR combinada con la técnica de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) (PCR-RFLP) permite además caracterizar las distintas variantes de los genes *vt1* y *vt2* (Ziebell *et al.* 2002; De Baets *et al.* 2004; Beutin *et al.* 2007, Leotta *et al.* 2008; Aslani y Bouzari 2009), lo

cual ha facilitado la discriminación entre cepas desde el punto de vista epidemiológico y ha hecho posible la comparación de los distintos subtipos hallados internacionalmente de los genes *vt* (Bastian *et al.* 1998). Este subtipado de los genes *vt* puede tener importancia asimismo desde un punto de vista patogénico, ya que se considera que la evolución clínica y la gravedad de las infecciones debidas a ECVT dependen del tipo y subtipo de genes *vt* de la cepa implicada (Piérard *et al.* 1998; Friederich *et al.* 2002; Kawano *et al.* 2008). Los diferentes protocolos de PCR para los genes *vt* publicados hasta el momento han hecho posible la detección rápida de los ECVT no O157 a partir de muestras clínicas y, por tanto, el diagnóstico de las infecciones provocadas por este tipo de patógenos (Blanco *et al.* 2004d).

Por otro lado, se han desarrollado protocolos de PCR que permiten la detección de los serogrupos O más comunes de una forma más rápida y eficiente que la que se consigue con los métodos tradicionales de serotipado (Wang *et al.* 2001; Feng *et al.* 2004, 2005; Beutin *et al.* 2005b, 2005c; Beutin y Strauch 2007; Liu *et al.* 2007; Iguchi *et al.* 2015b, 2016; Iguchi, 2016). Del mismo modo, el tipado del gen flagelar *fliC* mediante PCR-RFLP ha permitido la detección del gen que codifica ciertos antígenos H en casos en los que el serotipado convencional presenta dificultades (Prager *et al.* 2003; Beutin y Strauch, 2007; Aslani y Bouzari 2009).

El desarrollo de técnicas basadas en la PCR dio lugar a aplicaciones como la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) o la PCR múltiple para la detección simultánea de varios genes de virulencia, ampliamente utilizados en los últimos años (Paton y Patón, 2002, 2005; Osek, 2003; Sekse *et al.* 2005; Müller *et al.* 2006; Aranda *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007; Ooka *et al.* 2009; Bai *et al.* 2010, 2012; Paddock *et al.* 2013a). Muchos ensayos de RT-PCR se han desarrollado para patógenos de origen alimentario, ofreciendo una detección rápida, sensible y específica de una serie de agentes patógenos, tras el cultivo de enriquecimiento, así como su cuantificación (Foley y Grant, 2007; Eleizalde *et al.* 2012). Las ventajas de estos ensayos, junto con su facilidad de uso y la susceptibilidad a la automatización los hacen muy atractivos para su aplicación en alimentos, con el fin de superar la larga etapa de cultivo de enriquecimiento (Foley y Grant, 2007). Existe un número creciente de kits de RT-PCR, disponibles comercialmente, para la detección de patógenos transmitidos por alimentos (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014).

1.6.6.2.2. *Electroforesis en campos pulsantes (PFGE)*

La técnica de electroforesis en campos pulsantes (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) fue descrita en 1984 como una herramienta para examinar el ADN cromosómico de organismos eucariotas, y ha sido uno de los progresos más útiles de la epidemiología molecular en las décadas pasadas, ya que ha demostrado que es altamente efectiva para

muchas especies bacterianas tanto para gram-positivas como para gram-negativas (Goering, 1993, 2000; Tenover *et al.* 1995, 1997; Struelens *et al.* 2001; Warner y Onderdonk, 2003).

En esta técnica se usan enzimas de restricción que cortan de manera infrecuente el ADN cromosómico para generar fragmentos muy grandes que son separados por electroforesis. Los fragmentos de ADN generados son mayores de 40 kb y se pueden separar si se alterna cíclicamente la orientación del campo eléctrico durante la electroforesis (Figura 10).

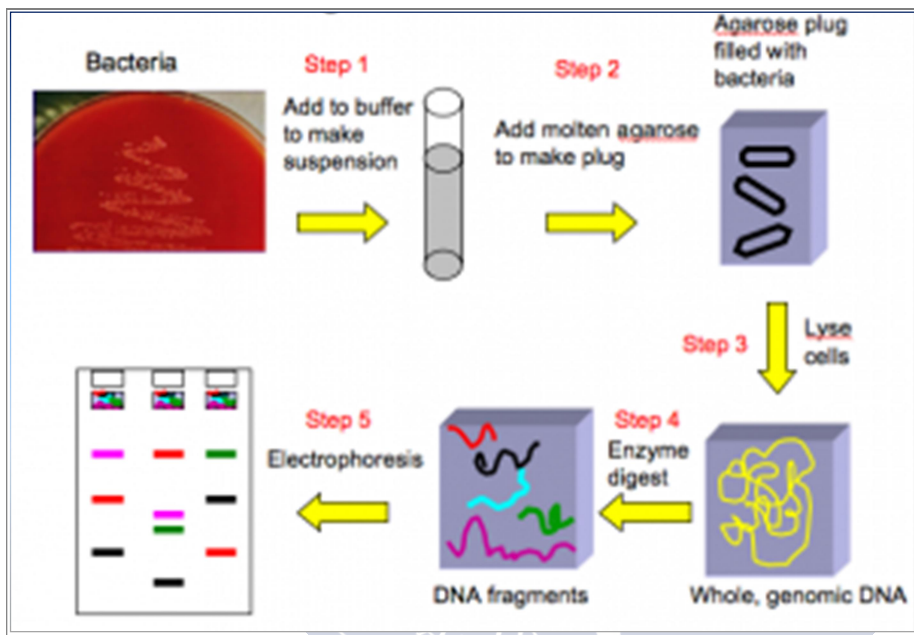


Figura 10. Proceso de realización de la técnica de PFGE. Fuente: <http://www.foodsafetynews.com/2009/08/genetic-testing-1/>

Esta técnica fue detallada por primera vez para el ECVT O157 por Böhm y Karch (1992) y desde entonces se han publicado un gran número de estudios que demuestran que la técnica es interesante desde el punto de vista epidemiológico (Barret *et al.* 1994; Meng *et al.* 1995; Krause *et al.* 1996; Izumiya *et al.* 1997; Allison *et al.* 1998, 2000; Heir *et al.* 2000; Preston *et al.* 2000; Foley *et al.* 2004; Mora *et al.* 2004; Nagano *et al.* 2004; Singer *et al.* 2004; Bidet *et al.* 2005; Ahmed *et al.* 2005; Tsai *et al.* 2005; Yoshii *et al.* 2009; CDC, 2010; Masana *et al.* 2010). Esta técnica proporciona un análisis completo del ADN cromosómico al incluir en el mismo más del 90% del cromosoma bacteriano. El uso de uno o más enzimas de restricción permite la detección de diferencias en el ADN cromosómico entre los aislados, puesto que los patrones de macrorrestricción resultantes, integrados por grandes fragmentos de ADN, reflejan las distancias existentes entre sitios de corte a lo largo del cromosoma bacteriano (Tenover *et al.* 1995; Goering, 2000). Por tanto, la comparación de estos patrones permite determinar las relaciones existentes entre un aislado y cada uno de los otros con los que se compare, si bien, es necesario revisar los criterios con respecto a la interpretación de las diferencias en las

bandas obtenidas de los análisis de PFGE para poder estandarizar la interpretación de los resultados obtenidos con esta técnica, puesto que los criterios interpretativos propuestos para los perfiles de PFGE no incluyen evidencias experimentales que expliquen variaciones mínimas observadas entre cepas con altas similitudes (Tenover *et al.* 1995; Durmaz *et al.* 2009). Según los criterios de Tenover *et al.* (1995), un aislamiento puede considerarse relacionado con el perfil patrón de PFGE de un brote incluso si difiere en 4-6 bandas. Otros autores (Barrett *et al.* 1994), sin embargo, sugieren que diferencias de incluso una banda harían que una cepa probablemente no estuviera relacionada con un brote. De acuerdo con las observaciones de Smith *et al.* (2000), que utilizaron en su estudio el sistema de análisis de FAFLP (*Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*) y PFGE, habría que tener en cuenta el contexto epidemiológico a la hora de interpretar los resultados. Así, si el contexto epidemiológico lo apoya, una única banda de diferencia en el análisis puede definir una nueva cepa. Contrariamente, en otras condiciones epidemiológicas, uno o dos fragmentos de diferencia entre aislamientos no impiden que se definan como el mismo grupo clonal.

Barrett y colaboradores (2006) revisaron los criterios de Tenover en base a sus experiencias en el plan nacional de subtipado de patógenos alimentarios de tipo bacteriano llevado a cabo por el CDC de Atlanta (sistema PulseNet USA). Entre estas cuestiones, estos autores recomiendan considerar como “diferentes” aquellos perfiles de PFGE entre los que se observe cualquier diferencia, y como “indistinguibles” aquellos en los que no sea evidente ninguna diferencia en las condiciones ensayadas, por considerarlo un término más preciso que “idénticos”. Además, para una correcta interpretación de los perfiles, consideran necesario tener en cuenta previamente una serie de aspectos, como son: suficiente calidad del gel para poder ser interpretado correctamente; tener en cuenta la diversidad del microorganismo analizado; conocer las condiciones en las que tiene lugar la transmisión prolongada en el tiempo, y por último, otro aspecto muy importante a tener en cuenta es la interpretación global de los datos de laboratorio junto con el contexto epidemiológico, ya que los resultados de la PFGE en exclusiva no permiten establecer una conexión epidemiológica entre aislados.

La rigurosa estandarización del protocolo de PFGE con la enzima de restricción *XbaI* ha permitido la obtención de patrones de macrorrestricción comparables entre todos los laboratorios integrados en el sistema PulseNet en EE.UU. (Gerner-Smith *et al.* 2006; Gerner-Smith y Scheutz 2006) y en otros países (Fisher y Threlfall, 2005; Terajima *et al.* 2006). Además, el poder discriminativo de la PFGE puede incrementarse mediante el empleo de una segunda enzima de restricción, como puede ser *BlnI* (Hyytiä-Trees *et al.* 2006; Arthur *et al.* 2007; Leotta *et al.* 2008; Pei *et al.* 2008) o *SpeI*, en caso de resistencia a la digestión con *BlnI* (Arthur *et al.* 2007; Pei *et al.* 2008). Con este fin se han empleado también otras enzimas como *NotI* (Rice *et al.* 1999; Geue *et al.* 2006) o *SfiI* (Harsono *et al.* 1993; Lee *et al.* 1996; Ríos *et al.* 1999).

En general, la PFGE ha desempeñado un papel fundamental en la identificación de fuentes de infección en brotes y casos esporádicos de infección, al permitir contrastar la identidad de aislados obtenidos a partir de animales, alimentos y/o muestras ambientales con los aislados procedentes de pacientes (Trevena *et al.* 1996; Chapman *et al.* 2000a, Licence *et al.* 2001; Alleberger *et al.* 2003; Bopp *et al.* 2003; Ferguson *et al.* 2005; CDC, 2006; Espie *et al.* 2006; Conedera *et al.* 2007; Denny *et al.* 2008; Sartz *et al.* 2008; Sekse *et al.* 2009; CDC, 2010; Barret *et al.* 2012; Trotz-Williams *et al.* 2012). Esta técnica ha permitido detectar brotes que de otra forma pasarían inadvertidos. Así, Tauxe (2006) demostró que el uso de esta técnica en un estado de EE.UU. había propiciado un incremento del 67% en la sensibilidad para la detección de brotes de infección. Por otro lado, el empleo continuado de esta técnica ha proporcionado una visión de conjunto de las infecciones que tienen lugar en cada país, poniendo de manifiesto, por ejemplo, que en países como Dinamarca, la mayoría de las infecciones que suceden son de carácter esporádico (Nielsen *et al.* 2006). Además, cepas que no son tipables por serotipado (ONT o HNM) en ocasiones pueden asociarse con un serogrupo O concreto, en virtud de la similitud de su perfil de PFGE con los de otros ECVT pertenecientes a algún serogrupo O conocido (Gyles, 2007).

La técnica de PFGE es un método de elección porque muestra un alto nivel de discriminación y reproductibilidad, por ello ha sido escogida por el CDC de Atlanta para realizar un plan nacional de subtipado de los patógenos bacterianos asociados a brotes de alimentos, entre ellos el ECVT O157 (Strockbine *et al.* 1998). De acuerdo con las observaciones de Preston *et al.* (2000) el fagotipado, junto con el tipado por PFGE, constituyen procedimientos complementarios para el subtipado del ECVT O157, y la combinación de ambos proporciona una discriminación óptima. Además, este método ha sido avalado por la EFSA, al otorgarle, en la evaluación de métodos de tipado molecular, la máxima calificación en base a 3 criterios: a) vigilancia de rutina de enfermedades, b) seguimiento y control de brotes y c) seguimiento y control de casos puntuales que afecten a la salud pública (EFSA/ECDC, 2014).

Sin embargo, debido a las limitaciones de la técnica, se está tratando de sustituir por análisis de secuenciación del genoma completo (WGS), de hecho, ya se está haciendo en *Listeria*. La WGS proporciona datos más detallados y precisos para identificar brotes que la técnica de PFGE, ya que, en lugar de tener solo la capacidad de comparar genomas bacterianos utilizando 15-30 bandas, que aparecen en un patrón PFGE, en WGS se obtienen millones de bases para comparar. Además, empleando WGS, se ha demostrado que algunas bacterias que parecían ser diferentes utilizando PFGE tenían en realidad un origen común (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/wgs.html>).

1.6.6.2.3. MLVA

La técnica de MLVA (*multiple-locus variable-number tandem repeats analysis*) es otro método genotípico de subtipado (Noller *et al.* 2003; Keys *et al.* 2005; Hyytiä-Trees *et al.* 2006). En la valoración de la EFSA/ECDC (2014), fue el segundo método de tipado mejor valorado. Se basa en la existencia de variaciones en el número de repeticiones de determinadas secuencias repetitivas en tándem existentes en una serie de *loci* específicos a lo largo del ADN cromosómico, y utiliza técnicas de PCR dirigidas a dichos *loci*. Se trata de un método relativamente simple, robusto y rápido que parece mostrar una sensibilidad similar a la de la PFGE, aunque una especificidad superior (Lindstedt *et al.* 2003, 2004; Noller *et al.* 2003, Keys *et al.* 2005; Kawamori *et al.* 2008; Pei *et al.* 2008) (Figura 11).

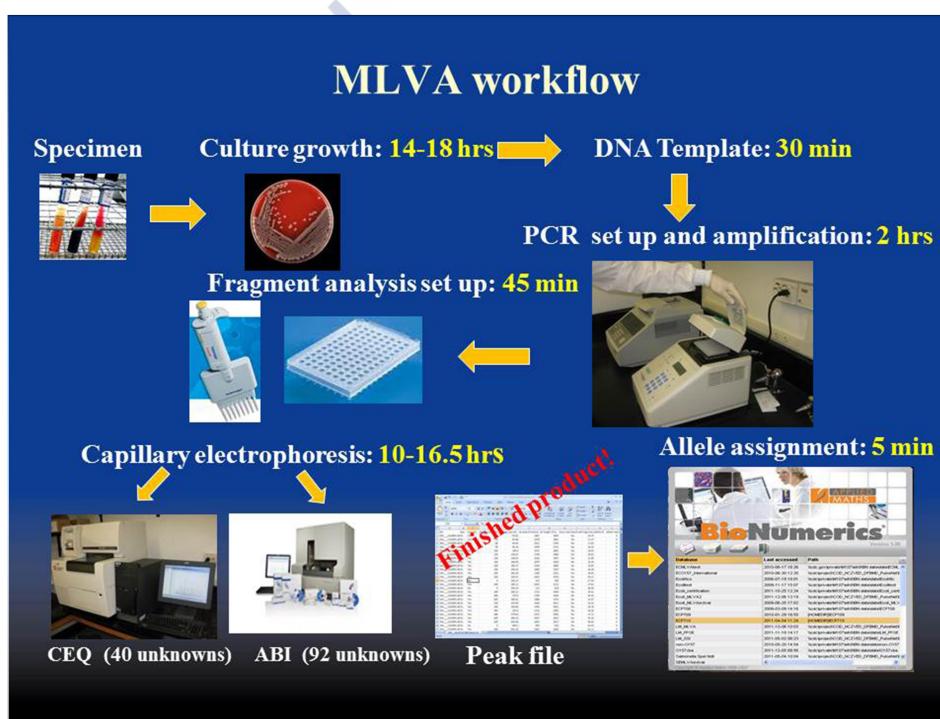


Figura 11. Proceso de realización de la técnica de tipado molecular MLVA. Fuente: <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html>

Varios estudios publicados han empleado la técnica de MLVA, generalmente de forma conjunta con la de PFGE, en comparaciones epidemiológicas (Murphy *et al.* 2008; Pei *et al.* 2008) y para distinguir brotes y casos esporádicos de infección por el ECVT O157 (Noller *et al.* 2003, Cooley *et al.* 2007; Kawamori *et al.* 2008; Pei *et al.* 2008; Perry *et al.* 2013). Además, algunos estudios han aplicado con éxito este método en el subtipado de ECVT no O157 (Keys *et al.* 2005; Lindstedt *et al.* 2007; Kumar *et al.* 2014), permitiendo con ello la detección de 2 brotes de SUH provocados por ECVT del serogrupo O103 en Noruega, así como el establecimiento de la fuente de infección en ambos casos (Lindstedt *et al.* 2007; Schimmer *et al.* 2008).

1.6.6.2.4. MLST

Características de la técnica

La técnica de MLST (*multilocus sequence typing*) fue diseñada para identificar clones y/o líneas clonales, fundamentalmente en poblaciones bacterianas. Es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo (identificación de grupos poblacionales con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente), aunque, ocasionalmente, se ha utilizado para dar respuesta a los típicos interrogantes planteados en epidemiología local o a corto plazo (caracterización de brotes, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, etc.). Además es una técnica genética muy empleada para realizar clasificaciones taxonómicas de bacterias, hongos patógenos y parásitos.

Este método está basado en la existencia de variaciones en las secuencias nucleotídicas de fragmentos internos de algunos genes altamente conservados (Gyles, 2007). En general, solo ciertas regiones de los genes presentan variabilidad, mientras que el resto del *locus* está conservado. Este hecho ha permitido desarrollar esta técnica, en la que de cada gen, solo es necesario el análisis de un fragmento interno de entre 450-500 pb. Así, la combinación de la variabilidad de los genes analizados proporciona un alto grado de discriminación. De este modo, estudiando tan solo 7 *loci*, se podrían distinguir hasta 30^7 genotipos diferentes. Esta circunstancia ha llevado a consensuar 7 como el número de *loci* adecuado para el análisis por secuenciación de los fragmentos seleccionados. La secuencia obtenida de cada uno de los fragmentos se compara con una base de datos de alelos de cada gen en particular y se le asigna un identificador numérico. Las combinaciones de estos perfiles alélicos recibe el nombre de secuencia tipo o *sequence type* (ST) (Figura 12).

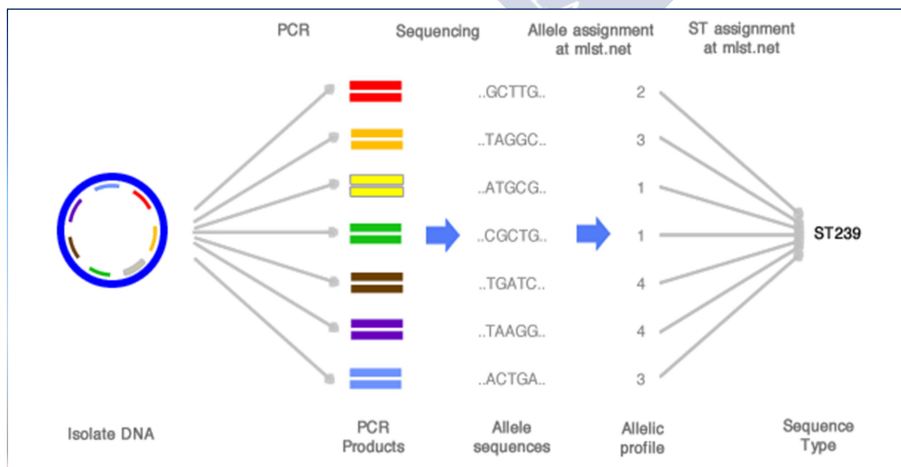


Figura 12. Técnica de MLST. Fuente: <http://beta.mlst.net/Instructions/default.html>

Para el análisis de las cepas de *E. coli* existen 3 esquemas de MLST, cada uno basado en un conjunto diferente de genes (Reid *et al.* 2000, Wirth *et al.* 2006, Jaureguy *et al.* 2008), aunque probablemente el más utilizado sea el de Achtman, además, parece ser el más estable y congruente con filogenias del genoma completo (Chaudhuri y Henderson, 2012; Clermont *et al.* 2015):

- **Esquema de Achtman:** las cepas aisladas se tipifican amplificando fragmentos de 7 genes (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) siguiendo los protocolos disponibles en la página web: http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search.
- **Esquema de Pasteur:** se basa en la amplificación de fragmentos de 8 genes (*dinB*, *icd*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB*, *uidA*) mediante la utilización de los protocolos disponibles en la página web: <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html>.
- **Esquema de Whittam:** las cepas se tipifican amplificando fragmentos de hasta 15 genes (*arcA*, *aroE*, *aspC*, *clpX*, *cyaA*, *dnaG*, *fadD*, *grpE*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, *mtlD*, *mutS*, *rpoS*, *uidA*) según las condiciones establecidas en los protocolos disponibles en la página web: http://www.shigatox.net/ecmlst_arcA

El poder de discriminación de MLST es muy inferior al que se obtiene con la aplicación de otros marcadores como el análisis del ADN mediante PFGE, técnicas de tipificación por PCR, AFLP, etc. puesto que su objetivo es el análisis de regiones altamente conservadas eliminando la variabilidad aportada por eventos recombinantes. Un inconveniente de esta técnica es que para cada cepa deben realizarse al menos 7 reacciones de amplificación y 14 reacciones de secuenciación (según el esquema empleado), lo que hace que sea una técnica costosa, laboriosa y que precisa de tecnología de secuenciación automática. Actualmente, la técnica de MLST por secuenciación Sanger está siendo sustituida por WGS, con la ventaja de que corrige los errores de la primera.

Análisis evolutivos de las ST

La secuenciación del genoma está generando gran cantidad de datos de secuencias. Con el fin de llevar a cabo análisis eficientes de toda esta información, se necesitan programas informáticos basados en algoritmos computacionales rápidos y métodos estadísticos (http://www.megasoftware.net/web_help_7/helpfile.htm#hc_first_time_user.htm).

El análisis de las ST a través de este tipo de programas buscan conocer las relaciones evolutivas y las estructuras poblacionales bacterianas de diferentes aislados. Dos de los programas ampliamente utilizados son:

- **MEGA** (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (<http://www.megasoftware.net/>) (Kumar *et al.* 2001) es una herramienta que realiza alineamientos de manera automática o manual, genera árboles filogenéticos, estima rangos de evolución molecular y prueba hipótesis evolutivas. Además cuenta con acceso directo a bases de datos como NCBI, evitando la necesidad de tener que entrar a la página mediante el explorador y descargar la secuencia directamente al programa. El objetivo del software MEGA ha sido proporcionar herramientas para explorar, descubrir y analizar secuencias de ADN y proteínas desde una perspectiva evolutiva. La primera versión fue desarrollada para los recursos computacionales limitados que estaban disponibles en un ordenador medio a principios de los años noventa. MEGA1 hizo que muchos métodos de análisis evolutivo fueran fácilmente accesibles a la comunidad científica para la investigación y la educación. Este software fue mejorando a través de las distintas versiones, llegando a MEGA6 que representa un salto adelante en términos de rendimiento. Un nuevo gestor de memoria y un compilador actualizado han hecho posible que MEGA6 asigne el doble de memoria en sistemas de 64 bits que MEGA5. Actualmente, MEGA se encuentra ya en la versión 7, que logra otro salto adelante en términos de rendimiento (<http://www.megasoftware.net/>).
- El **algoritmo BURST**, fue ideado y desarrollado por Ed Feil (Universidad de Bath), como una forma de mostrar las relaciones entre aislados estrechamente relacionados de una especie o población bacteriana (Feil *et al.* 2004). BURST, a diferencia de los diagramas, árboles o dendrogramas, utiliza un modelo simple pero apropiado de evolución bacteriana en el que un genotipo ancestral (o fundador) aumenta en frecuencia en la población y, al hacerlo, comienza a diversificarse para producir un grupo, relacionando todos los genotipos que son descendientes del genotipo fundador. Este grupo de genotipos relacionados se denomina a menudo como un "complejo clonal".

La introducción de la tipificación mediante MLST para la caracterización precisa de aislamientos de patógenos bacterianos ha tenido un marcado impacto tanto en la vigilancia epidemiológica rutinaria global, como en la biología de poblaciones microbianas. En ambos campos, un requisito clave para explotar este recurso es la capacidad de discernir la relación y los patrones de descendencia evolutiva entre aislamientos con genotipos similares.

Las técnicas de agrupamiento tradicionales, como los dendrogramas, proporcionan una representación muy pobre de los eventos evolutivos recientes, ya que intentan reconstruir las relaciones en ausencia de un modelo realista de la forma en que los clones bacterianos emergen y se diversifican para formar complejos clonales. Una implementación del algoritmo

BURST, eBURST (<http://eburst.mlst.net/>), que divide un conjunto de datos de MLST de cualquier tamaño en grupos de aislados y complejos clonales, predice el genotipo fundador (ancestral) de cada complejo clonal y calcula la fiabilidad de la asignación (Feil *et al.* 2004).

La principal ventaja de eBURST es que implementa el modelo más simple para la aparición de complejos clonales (Smith *et al.* 2000; Feil *et al.* 2001): un genotipo dado aumenta en frecuencia en la población, convirtiéndose en un fundador, y este aumento se acompaña de una diversificación gradual de ese genotipo, por mutación y recombinación, formando un grupo de cepas estrechamente relacionadas desde el punto de vista filogenético. Esta diversificación del genotipo "fundador" se refleja en la aparición de ST que difieren sólo en una secuencia genética a partir del genotipo fundador (variantes de *locus* único o SLV). Una mayor diversificación de las SLV dará como resultado la aparición de variaciones del genotipo original con más de una diferencia en el perfil alélico (variantes de doble *locus* DLV), variantes de *locus* triples (TLV), y así sucesivamente.

Tras la aplicación del algoritmo eBURST a un conjunto de datos completo, el resultado es un conjunto de árboles disjuntos (gráficos acíclicos), donde cada árbol corresponde a un complejo clonal. Por lo tanto, al considerar sólo los enlaces SLV, eBURST no tiene como objetivo vincular a toda la población, sino que identifica diferentes complejos clonales. El análisis de eBURST de los resultados de MLST consiste en construir un conjunto de árboles que se extiende en un gráfico donde cada ST es un nodo y 2 ST se conectan si, y solamente si, son SLV. Este conjunto de árboles debe ser óptimo con respecto a la selección de enlaces. En caso de empate se deben considerar el número de DLV, el número de TLV y por último la frecuencia de ocurrencia de ST. La implementación actual de las reglas BURST en el algoritmo eBURST puede no proporcionar una solución óptima. Para lograr este objetivo, Francisco y colaboradores (2009) propusieron el siguiente algoritmo (goeBURST): si se comienza con un conjunto de árboles de *singleton* (cada ST es un árbol), se podría construir el conjunto de árboles óptimo seleccionando iterativamente los enlaces que conectan ST en diferentes árboles y con el mayor número de árboles SLV. Estos autores, probaron varios conjuntos de datos públicos de MLST y encontraron diferencias entre las 2 implementaciones al analizar 5 especies bacterianas: *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni* y *Neisseria* spp.

GoeBURST es una implementación java de las reglas del algoritmo eBURST propuestas por Feil y colaboradores (2004), utilizando un enfoque de matriz gráfica que asegura una solución óptima para la colocación de enlaces entre las ST. Está disponible en <http://goeBURST.phyloviz.net>. GoeBURST permite al investigador determinar mediante inspección visual del árbol si un enlace representa una conexión fiable entre las ST o si existen otras conexiones con una calidad ligeramente peor, alertando de la posibilidad de patrones alternativos de evolución (Francisco *et al.* 2009).

La aplicabilidad general de las matrices gráficas y el modelo evolutivo que sustenta las reglas eBURST sugieren que goeBURST podría utilizarse con éxito para el análisis de otros datos de tipificación microbiana. Cualquier metodología de MLST cuyos resultados se pueden codificar en una secuencia numérica o de caracteres y en la cual, la similitud entre 2 perfiles de este tipo puede evaluarse por el número de diferencias, es susceptible de análisis por goeBURST, de hecho, se aplicó a varias bases de datos públicas MLST para los microorganismos clínicamente relevantes: *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *upsaliensis Campylobacter*, *Streptococcus suis*, *Neisseria spp*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Burkholderia pseudomallei* y *Enterococcus faecium* (Francisco *et al.* 2009).

1.6.6.3. Secuenciación genómica masiva

Dentro de las técnicas moleculares hay que destacar una técnica muy reciente como es la secuenciación masiva o *Whole Genome Sequencing* (WGS) (Figura 13). El abaratamiento y mejora de las técnicas basadas en la WGS han marcado un antes y un después en el tipado molecular, permitiéndonos entender mejor cualquier variación dentro y entre especies, lo que se traduce en la capacidad de diferenciar organismos con una precisión que no permite ninguna otra tecnología. Así, por ejemplo, la WGS se podría utilizar para determinar con precisión subtipos de *E. coli* que se basan en la variación alélica o diferencias en el contenido de genes, tales como el serotipado y patotipado. La WGS también proporciona información sobre los polimorfismos de un solo nucleótido en el genoma de *E. coli*, que forman la base de la tipificación de secuencias, y es más fiable que otros sistemas para el seguimiento de la evolución y propagación de cepas individuales. Combinada con metadatos clínicos, patológicos y epidemiológicos, la WGS permitirá también elucidar qué cepas dentro de un subtipo son más virulentas que otras (Robins-Browne, *et al.* 2016).

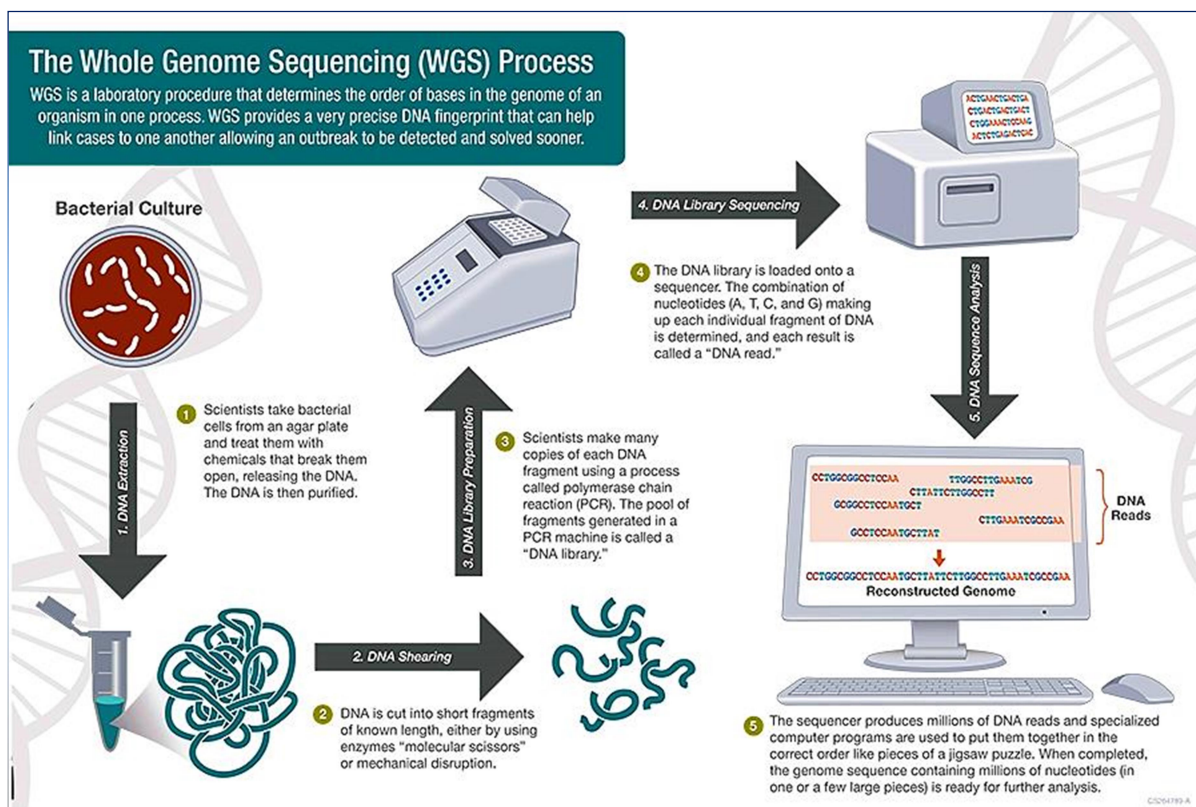


Figura 13. Técnica de secuenciación masiva (WGS). Fuente: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html#wgs>

El beneficio más prometedor y de mayor envergadura a nivel de seguridad alimentaria de este tipo de técnicas, consiste en la combinación de la información genómica de un patógeno de transmisión alimentaria, con su ubicación geográfica, y la aplicación de los principios de la biología evolutiva para determinar la relación de los agentes patógenos. Puesto que la información genómica de una especie patógena transmitida por los alimentos que se encuentran en un área geográfica determinada es diferente de la información genómica de la misma especie patógena que se encuentra en otra área, conocer las áreas geográficas a las que los patógenos están típicamente vinculados puede ser una herramienta muy poderosa en la búsqueda del origen de la contaminación de un producto alimentario. Esto supondría una reducción significativa tanto en costes económicos, como en la morbilidad y mortalidad de los brotes provocados por ECVT, ya que cuanto antes se produzca la identificación de la fuente de contaminación, más rápida será la retirada del mercado del producto (<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenomeSequencingProgramWGS/>).

Cada día son más los estudios que utilizan esta técnica para la rápida identificación de brotes provocados por cepas de ECVT, poniendo de manifiesto su utilidad (Dallman *et al.* 2015; Butcher *et al.* 2016). La WGS permite la identificación de casos con una especificidad y una sensibilidad sin precedentes que facilitará las investigaciones de salud pública específicas. Además con la secuenciación masiva se puede tener ahora un genoma bacteriano en menos

tiempo y a un coste mucho menor de lo que hasta ahora era posible (Lambert *et al.* 2015), por lo que esta técnica proporcionará una alternativa rápida y más barata a las técnicas de tipificación convencionales (Lindsey *et al.* 2016).

1.6.6.4. Proteómica: MALDI-TOF

La espectrometría de masas ha aportado un gran número de posibilidades en el campo de la proteómica. Los avances obtenidos en los últimos 10 años han sido sobresalientes y han permitido una adquisición y comparación de datos más rápida y fiable.

La metodología MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* y TOF (*Time-Of-Flight*) por el detector de iones que se acopla al MALDI. MALDI-TOF permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como las proteínas, los péptidos y los azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como los polímeros, los dendrímeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales.

MALDI-TOF MS proporcionó la capacidad de eliminar los métodos de extracción de proteínas previos a los análisis, permitiendo que los microorganismos intactos fueran simplemente colocados sobre una placa sólida y mezclados o superpuestos con un compuesto de matriz y cocrystalizados, lo que facilita la disociación e ionización de proteínas bacterianas (Claydon *et al.* 1996; Holland *et al.* 1996). Debido al simple mecanismo de la preparación de la muestra, se convirtió en una alternativa atractiva a los métodos fenotípicos y genéticos de identificación de microorganismos (Figura 14). No obstante, los datos relativos a algunos grupos de microorganismos son todavía controvertidos (Zárate *et al.* 2014).

Hoy en día, el análisis de rutina se realiza generalmente utilizando bases de datos que se comercializan con los sistemas MALDI-TOF MS. Dichas bases de datos espectrales son construidas y mantenidas por sus fabricantes, aunque se pueden ampliar añadiendo espectros que no se incluyen en las versiones comerciales. La capacidad de poder agregar espectros y construir bases de datos personalizadas es importante para un análisis discriminatorio adicional, incluyendo tipificación de cepas e investigaciones epidemiológicas (Clark *et al.* 2013).

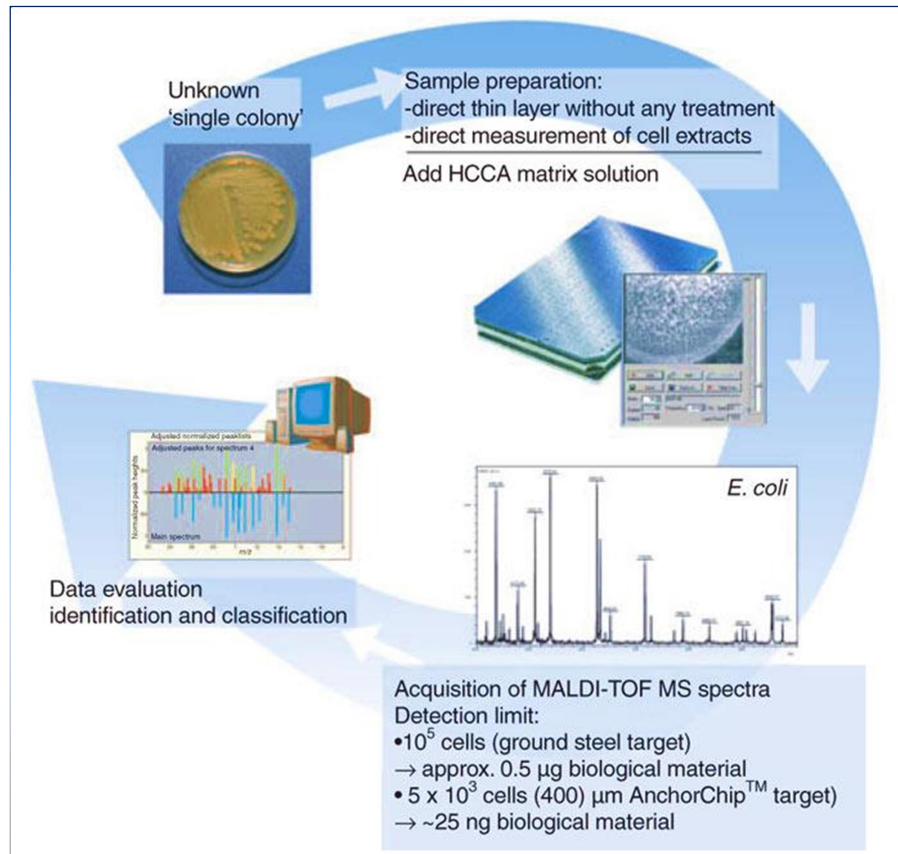


Figura 14. Técnica de MALDI-TOF MS. Fuente: https://www.researchgate.net/figure/General-workflow-for-ClinProt-BioTyper-microorganism-identification-and-classification_fig1_232788241

Ha demostrado ser una herramienta versátil para un gran número de aplicaciones. Así, se identificaron y agruparon perfiles de MALDI-TOF MS de hongos bacterianos clínicos (Eigner *et al.* 2009) y micobacterianos (Oswald-Richter *et al.* 2012) o hongos entomopatógenos del suelo (Lopes *et al.* 2014) y levaduras ambientales (Agustini *et al.* 2014; Calderaro *et al.* 2014). El MALDI-TOF MS también se utilizó para la detección de cepas resistentes a la meticilina de *Staphylococcus aureus* (Sparbier *et al.* 2013). Por otro lado, Zárate *et al.* (2014) demostraron que esta metodología constituyó un recurso valioso para la identificación de bacterias anaerobias aisladas de muestras clínicas. También se utilizó para la identificación de aislados de *E. coli* en un estudio realizado por Rasmussen y colaboradores. (2015). Por otro lado, Lafolie *et al.* (2015) observaron que mediante la técnica de MALDI-TOF MS se podía obtener una rápida identificación del clon de *E. coli* ST131, lo que podría ayudar a dirigir las medidas de control de la infección en pacientes portadores de *E. coli* multirresistente a los fármacos.



2. OBJETIVOS



En la presente Tesis Doctoral nos planteamos la caracterización de una amplia colección de cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicas (ECVT) procedentes de diferentes fuentes de aislamiento (humano, bovino, ovino, caprino, silvestre y de alimentos) y distintos orígenes geográficos, obtenida entre los años 1980-2011, e incluyendo los serotipos más frecuentemente implicados en patología humana. Para ello se utilizaron las herramientas de tipado fenotípico y genotípico mediante PCR, MLST y PFGE. La mayoría de las cepas procedían de casos aislados y no se conocía que tuvieran vínculos epidemiológicos.

Los objetivos específicos de este estudio fueron:

1. Definir los grupos clonales de las cepas de ECVT pertenecientes a los serotipos más prevalentes en España.
2. Determinar su potencial patógeno en base a marcadores genéticos de patogenicidad.
3. Identificar qué reservorios pueden actuar como fuentes de transmisión de cepas ECVT potencialmente patógenas para los humanos.
4. Definir la estructura poblacional de la colección en base al análisis de los eventos genéticos micro y macroevolutivos determinados.



3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. CONSERVACIÓN Y CEPAS CONTROL

Las cepas de *E. coli* aisladas y caracterizadas en este estudio, al igual que todas las cepas control, se sembraron por picadura en agar nutritivo 0,75% p/v (11,5 g/l agar nutritivo y 4 g/l caldo nutritivo (Difco)) para su conservación a temperatura ambiente en tubos vacutainer estériles. En la Tabla 18 se listan las cepas control utilizadas en los ensayos.

Tabla 18. Cepas control de referencia empleadas en este estudio

CÓDIGO CEPA	GENES/REGIONES DIANA
ECVT / ECEP / FILOGRUPOS / OTROS	
EDL-933	<i>vt1, vt2, eae, eae-γ1, O157 rfbE, fliC_{h7}, E-hlyA, terD, terB</i>
O157-156	<i>vt1, vt2, eae, eae-γ1, O157 rfbE, fliC_{h7}, E-hlyA, terD, terB</i>
O157-157	<i>vt1, vt2, eae, eae-γ1, O157 rfbE, fliC_{h7}, E-hlyA, terD, terB</i>
O157-41	<i>vt2, eae, eae-γ1, O157 rfbE, fliC_{h7}, stcE, arpA</i> , confirmación
O157-1103	<i>vt1, vt2, eae, eae-γ1, O157 rfbE, fliC_{h7}, stcE, arpA</i> , confirmación
IH2859f	<i>eae, bfpA</i>
FV174	<i>eae, bfpA</i>
VTB-27	<i>subAB</i> (variante plasmídica), <i>saa, arpA</i>
VTB-198	<i>subAB</i> (variante plasmídica), <i>saa, arpA</i>
FV5208	<i>subAB</i> (variante cromosómica)
FV5212	<i>subAB</i> (variante cromosómica)
O26-1	<i>katP, espP, iutA, E-hlyA</i>
O26-2	<i>katP, espP, iutA, E-hlyA</i>
FV19459	Confirmación filogrupo C
FV19460	Confirmación filogrupo C
FV10041	<i>chuA, yjaA, TSPE, cnf1, a-hlyA</i>
FV10042	<i>chuA, yjaA, TSPE, cnf1, a-hlyA</i>
FV10044	<i>iucD</i>
FV10045	<i>iucD</i>
CCB37-2	<i>cnf2</i>
FV7673	<i>cnf2</i>
FV7670	<i>cnf3</i>
O26-54	<i>cnf3</i>
FV9157	<i>a-hlyA</i>
FV168	<i>pCDV432, aaiC, aggR</i>
FV17952	<i>aggR, aaiC</i>
FV18218	<i>eltA, est</i>
FV18220	<i>est</i>

VARIEDADES VT	
FV15144	<i>vt1a, vt2a, eae-γ1, E-hlyA</i>
FV15145	<i>vt1c, vt2b</i>
FV15146	<i>vt1d</i>
FV15147	<i>vt1a, vt2a, E-hlyA</i>
FV15148	<i>vt2b</i>
FV15149	<i>vt2b, vt2c</i>
FV15150	<i>vt2d</i>
FV15151	<i>vt2e</i>
FV15152	<i>vt2f</i>
FV15153	<i>vt2g</i>
INTIMINAS	
FV10087	<i>eae-α1</i>
FV10091	<i>eae-α2</i>
FV10096	<i>eae-β1</i>
FV10098	<i>eae-β2B</i>
FV10101	<i>eae-β3</i>
FV10112	<i>eae-δ/κ</i>
FV10106	<i>eae-γ1</i>
FV10111	<i>eae-Θ/γ2</i>
FV10116	<i>eae-ε1</i>
FV10118	<i>eae-ε2</i>
FV10121	<i>eae-ε3</i>
FV10123	<i>eae-ε4</i>
FV10125	<i>eae-ζ</i>
FV10127	<i>eae-η1/η2</i>
FV10127	<i>eae-η1</i>
FV10129	<i>eae-η2</i>
FV10130	<i>eae-ι1</i>
FV10133	<i>eae-ι2</i>
FV10134	<i>eae-λ</i>
FV10137	<i>eae-μB</i>
FV10140	<i>eae-νB</i>
B49	<i>eae-ξB</i>
FV10145	<i>eae-ο</i>
FV10147	<i>eae-π</i>
FV10149	<i>eae-ρ</i>
FV10152	<i>eae-σ</i>
ANTÍGENOS O Y H	
FV17090	<i>rfbO25b</i>
LREC-O26	<i>wzx-O26</i>
LREC-O45	<i>wzy-O45</i>
LREC-O91	<i>wzx-O91</i>
LREC-O103	<i>wzx-O103</i>

LREC-O104	wzx-O104
LREC-O111	wzx-O111
LREC-O121	wzy-O121
LREC-O145	wzy-O145
LREC-O146	wzx-O146
LREC-O157	O157 <i>rfbE</i>
LREC-H2	<i>fliC</i> _{H2}
LREC-H4	<i>fliC</i> _{H4}
LREC-H7	<i>fliC</i> _{H7}
LREC-H8	<i>fliC</i> _{H8}
LREC-H10	<i>fliC</i> _{H10}
LREC-H11	<i>fliC</i> _{H11}
LREC-H21	<i>fliC</i> _{H21}
LREC-H25	<i>fliC</i> _{H25}
LREC-H28	<i>fliC</i> _{H28}
PFGE	
H9812	<i>Salmonella</i> Braenderup

3.2. COLECCIÓN DE ESTUDIO

En esta tesis doctoral se analizaron 820 cepas de ECVT seleccionadas de una colección de 900, que habían sido previamente detectadas como *vt* positivas. El criterio de selección utilizado fue en base a sus serotipos, de manera que se incluyeron aquellos más frecuentemente identificados en clínica humana, además de otros minoritarios, pero de interés, identificados en cepas de diferentes fuentes. Todas las cepas del estudio fueron aisladas en España, entre los años 1980 y 2011. En la Tabla 19 se detalla su distribución por serotipo y origen de aislamiento.

Tabla 19. Distribución de las 820 cepas de ECVT del presente estudio por serotipo y origen de aislamiento

Serotipo	Origen de aislamiento									
	Humano	Bovino	Ovino	Caprino	Carne vacuno	Leche oveja	Leche cabra	Animales Silvestres	Productos agrícolas	Total cepas
O5:HNM	3		4	6	1			1		15
O8:H2		7								7
O20:H19	1	9								10
O26:[H11]/HNM	63	34	9		6	8		5		125
O75:[H8]	1							2		3
O76:H19	5		7	17				1		30
O77:H41	2	8			2					12
O91:[H14]/HNM/[H21]	5	6	21		1					33
O98:[H21]	1							1		2
O103:[H2]	4	5			2					11
O104:H7/ H21		2	10							12
O111:[H8]	7	2			2					11
O113:H21	6	5			2					13
O117:HNM			9							9
O118:H16/HNM	8	4			1					13
O121:H19	1							1		2
O128:[H2]	4		22	5						31
O145:[H28]	6				1			1		8
O146:[H21]/[H28]	18	1	31	12	1	5		49	2	119
O156:[H10]/[H25]	3	9	10							22
O157:[H7]	143	78	22	3	16	22	1	4		289
O166:H28	3	1	19	11	1	8				43
Total cepas	284	171	164	54	36	43	1	65	2	820

De las 820 cepas, 284 procedían de muestras clínicas humanas, 389 de rumiantes de producción (bovino, ovino, caprino), 65 de animales silvestres y 82 de alimentos (carne de vacuno, leche de oveja, leche de cabra y productos agrícolas). Las cepas de origen humano se aislaron de heces de pacientes en centros hospitalarios o asistenciales (en su mayoría implicadas en cuadros de tipo diarreico); las cepas de animales de producción se aislaron de las heces de portadores sanos y de animales con diarrea, bien en matadero o en las granjas; las cepas de animales silvestres se aislaron del contenido fecal de animales abatidos en cacerías autorizadas; por último, las cepas aisladas de alimentos procedían de muestreos realizados en puntos de venta al consumidor.

3.3. CULTIVO DIFERENCIAL Y BIOTIPADO

Para el cultivo de las cepas se utilizaron los siguientes medios: Tryptone soy agar (TSA) (Oxoid) como medio general y, como medios selectivos y diferenciales, agar MacConkey lactosa (MACL) (Oxoid), agar MacConkey sorbitol (MACS) (Oxoid) y agar MacConkey sorbitol con telurito y cefixima (MACSTC) (Oxoid). Los medios MACL y MACS permitieron diferenciar las cepas fermentadoras/no fermentadoras de lactosa y sorbitol, respectivamente.

El medio MACL es selectivo y diferencial para el aislamiento de bacterias coliformes y gérmenes entéricos. En su composición se incluyen sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de microorganismos gram positivos, lo que permite la selección y el aislamiento de bacterias gram negativas. En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora gram positiva y por último, el agar es el agente solidificante. Según la capacidad de la cepa aislada para fermentar carbohidratos se producen colonias incoloras o de color de rosa a rojo. Debido a la fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia lo que provoca un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias y la precipitación de las sales biliares. Sin embargo, los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras. Se sembraron todas las cepas empleando una placa para cada una. La siembra se realizó en estría con el objetivo de, por un lado, observar la fermentación de la lactosa, y por otro, ver que la cepa no estaba contaminada con algún otro microorganismo. Las placas se incubaron a 37 °C y las lecturas se realizaron a las 24 horas.

El ECVT O157 fermenta la lactosa, como la mayoría de las cepas de *E. coli*, pero a diferencia de éstas, no fermenta el sorbitol. Los medios de cultivo que contienen lactosa no permiten diferenciar entre estas cepas de *E. coli*, por este motivo se ha desarrollado el agar MACS, el cual es un medio de cultivo similar en su formulación al MACL excepto en que se ha reemplazado la cantidad de lactosa por igual cantidad de sorbitol, lográndose así un medio nutritivo, selectivo y diferencial en base a la fermentación del sorbitol. El agar MACS fue uno de los primeros medios en utilizarse para aislar estos microorganismos (Ewing y Edwards, 1954; March y Ratman, 1986). En este medio, las peptonas proporcionan nitrógeno, el D-sorbitol es un carbohidrato fermentable, las sales biliares y el cristal violeta son agentes selectivos que inhiben el crecimiento de organismos gram positivos y el rojo neutro es un indicador del pH. Los microorganismos fermentadores de sorbitol crecen observándose como colonias rosadas-rojizas ya que por fermentación del sorbitol disminuye el PH alrededor de la colonia, esto produce un viraje del color del indicador de PH (rojo neutro), la absorción en las colonias y la precipitación de las sales biliares. De esta manera, como el ECVT O157 no fermenta el sorbitol va a dar lugar a colonias transparentes mientras que la mayoría de las cepas de *E. coli*, como son capaces de fermentar el sorbitol, producen colonias rosadas-rojizas.

El ECVT O157 además, es capaz de crecer en presencia de telurito y de cefixima. Basándose en estas propiedades se desarrolló el medio MACSTC, idóneo para la detección de ECVT O157, ya que inhibe el desarrollo de la mayoría de microbiota contaminante, y por otro lado, diferenciando las cepas no fermentadoras de sorbitol. Tanto para el MACS, como para el MACSTC se ensayaron 10 cepas por placa. Las placas se incubaron a 37 °C y las lecturas se realizaron a las 24 horas.

Todas las cepas se analizaron para la producción de la β -glucuronidasa utilizando el medio Chromocult (Merk). Se trata de un medio selectivo para la identificación simultánea de coliformes totales y *E. coli* en base a la combinación de 2 sustratos cromógenos. El sustrato Salmon-GAL es escindido por la β -galactosidasa característico de coliformes y provoca una coloración roja de las colonias. La identificación de la β -glucuronidasa característica de *E. coli* tiene lugar mediante el sustrato X-glucurónido, cuyo producto de escisión produce una coloración azul de las colonias. Puesto que la mayoría de las cepas de *E. coli* (con la excepción de, principalmente, las cepas ECVT O157) escinde los 2 sustratos presentes en este medio (Salmon-GAL y X-glucurónido), las colonias se tiñen de violeta-azul oscuro, siendo fáciles de diferenciar de los restantes coliformes y del ECVT O157 que se presentan de color rojo. Se ensayaron 10 cepas por placa y se incubaron a 37 °C. Las lecturas se realizaron a las 24 horas.

Además, la colección de cepas del serogrupo O26 se analizó para la fermentación de los azúcares dulcitol y L-ramnosa (Sigma Ltd.), utilizando el medio agar base con rojo fenol (Bacto phenol red agar base, Oxoid) suplementado con 1% (p/v) del carbohidrato correspondiente. El objetivo de analizar la fermentación de los citados azúcares era comprobar si entre las cepas O26 de nuestra colección también estaban presentes los 2 biotipos detectados en otros estudios (Leomil *et al.*, 2005; Miko *et al.*, 2010), en los que se ponía de manifiesto la importancia de la fermentación de los azúcares dulcitol y L-ramnosa en las cepas de *E. coli* del serogrupo O26. En este caso también se ensayaron 10 cepas por placa, sembradas por picadura, e incubadas a 37 °C. Se realizaron lecturas a las 24 y 48 horas.

Por otro lado, la colección de cepas del serogrupo O5 se analizó para la producción de la ureasa utilizando el medio Urea (Merk). Es un medio para la detección de microorganismos que son capaces de metabolizar la urea como única fuente de nitrógeno. En tal caso la ureasa bacteriana utiliza el sustrato urea. Al que libera amoníaco y se alcaliniza el medio. El objetivo de analizar la producción de la ureasa era identificar si entre las cepas O5 de nuestra colección estaban presentes productoras de ureasa, al igual que las descritas en estudios previos (Mercado *et al.* 2004; McLean *et al.* 2005). Cada cepa se inoculó en un tubo que contenía 2 ml de caldo urea y se incubaron a 37 °C. Las lecturas se realizaron a las 24 horas.

3.4 SEROTIPADO

La determinación del antígeno O y H de las cepas mediante serotipado se llevó a cabo siguiendo la metodología originalmente descrita por Guinée *et al.* (1981).

3.4.1 Determinación del antígeno O

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

PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES BACTERIANAS

- Cultivar las cepas problema en TSA e incubar (37 °C/18 h).
- Suspende el crecimiento que hemos obtenido en TSA en 2 ml de solución salina (0,85% ClNa, p/v) y ajustar la concentración bacteriana ($1,8 \times 10^9$ bacterias/ml) por comparación con el tubo número 6 de la escala McFarland.
- Calentar las suspensiones a 100 °C/1 h en un baño de agua, para destruir el antígeno K en el caso de que la cepa posea cápsula y desenmascarar el antígeno O.
- Una vez enfriadas las suspensiones, añadir a cada tubo 2 ml de solución salina formalinizada (0,5%, v/v) con violeta de genciana (0,005%, p/v). Conservar las suspensiones bacterianas a 4 °C durante un máximo de 1 semana.

DETERMINACIÓN PRESUNTIVA DEL SEROGRUPO O

- Enfrentar las suspensiones calentadas a 100 °C/1 h con los 24 antisueros polivalentes y las tratadas a 121 °C/2,5 h con los antisueros monovalentes O8, O9, O20 y O101 a la dilución de ensayo. Para ello, añadir a 50 µl de cada antígeno 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida. Tapar la placa e incubar (37 °C/18 h).
- Si la cepa bacteriana da aglutinación con alguno de los antisueros polivalentes empleados, se realiza a continuación el mismo proceso con los antisueros O monovalentes incluidos en el suero polivalente correspondiente. Realizar la confirmación del serogrupo O con las cepas que hayan sido aglutinadas por uno o más

antisueros O monovalentes. Si la cepa es negativa con todos los antisueros se considera no tipable (ONT).

- En los pocillos positivos, la aglutinación provoca la formación de una película que impide la sedimentación de las bacterias. En los pocillos negativos, las bacterias sedimentan dando lugar a la formación de unos acúmulos de bacterias que se visualizan en forma de botones azulados (Figura 15).

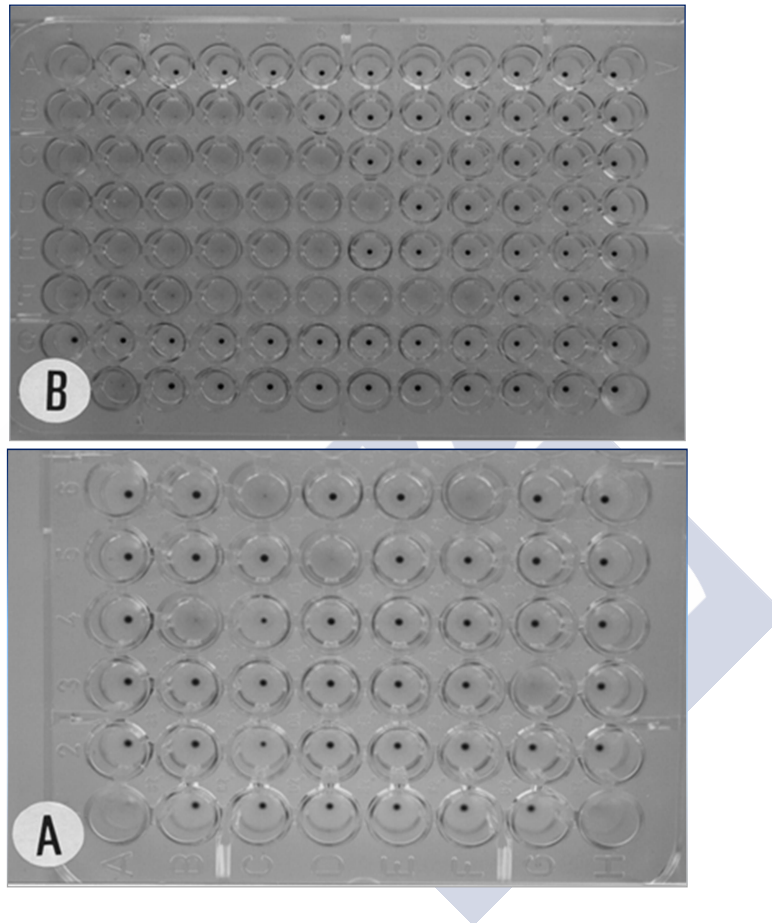


Figura 15. A) Detarminación presuntiva del antígeno O (serogrupo).
B) Titulación para la confirmación. Fuente: López, 2004

CONFIRMACIÓN DEL SEROGRUPO O

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

- Colocar 50 μ l de solución salina en todos los pocillos de cada fila, excepto en el n°1.
- Añadir a los pocillos n° 1 y n° 2 de cada fila 50 μ l de la dilución de ensayo del antisuero O correspondiente. Hacer diluciones seriadas (1:2), transfiriendo 50 μ l de la mezcla del

pocillo nº 2 al nº 3, mezclando y repitiendo la operación hasta llegar al pocillo nº 10. Utilizar los pocillos 11 y 12 como controles negativos, desechando los 50 µl que sobran después de mezclar en el pocillo nº 10.

- Añadir 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida a los 12 pocillos de cada fila, empezando por el nº 12 y avanzando hasta el nº 1. Tapar las placas e incubar (37 °C/18 h) y realizar la lectura de los resultados determinando los títulos.

El título será la máxima dilución del antisuero O que impide la sedimentación de las bacterias (Figura 15).

3.4.2 Determinación del antígeno H

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

El procedimiento es el siguiente:

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

- Utilizar 10 tubos de vidrio tipo Kahn para cada cepa problema. Dispensar 500 µl de cada uno de los 9 antisueros H polivalentes diluidos a 1/200 en los 9 primeros tubos, y 500 µl de solución salina (0,85%, p/v) en el décimo tubo que servirá como control negativo. A continuación, añadir 500 µl de la suspensión bacteriana formalinizada obtenida en el apartado anterior, e incubar en baño de agua (45 °C/2 h).
- Realizar la lectura de los resultados. La aglutinación se traduce en la formación de una película en el fondo del tubo, con el sobrenadante transparente. En los cultivos negativos para el polivalente con el que se ha enfrentado, la falta de aglutinación supone que el sobrenadante continua turbio con una turbidez equivalente al tubo de control negativo (Figura 16). Si no hay aglutinación con ninguno de los antisueros polivalentes, se considera que tiene un antígeno H no tipable (HNT).
- Si hay reacción positiva con alguno de los antisueros polivalentes, enfrentar la suspensión bacteriana con los antisueros monovalentes incluidos en el mismo. Para ello, dispensar 500 µl de cada antígeno H monovalente en tubos tipo Kahn y a continuación, añadir 500 µl de la suspensión bacteriana problema a cada uno de ellos e incubar en baño de agua (45°C/2h). El tubo en el que se observe una reacción aglutinante nos indicará el antígeno H de la cepa problema.



Figura 16. Determinación del antígeno H: A) aglutinación (reacción positiva); B) Control negativo. Fuente: Herrera, 2015

3.4.3 Asignación de seropatotipo

La asignación de seropatotipo se realizó en base a la clasificación establecida por Karmali y colaboradores (2003), a los datos epidemiológicos de estudios previos (Girardeau *et al.* 2005; Hussein, 2007; Coombes *et al.* 2008) y a la información obtenida de la propia colección de ECVT del LREC.

3.5. FAGOTIPADO

El fagotipado de las cepas de ECVT O157 fue realizado en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto Carlos III de Madrid, utilizando el esquema desarrollado en Canadá por Ahmed y colaboradores (1987). Dicho esquema utiliza 16 fagos, e identifica del orden de 90 fagotipos (Khakhria *et al.* 1990). El fagotipado es muy útil en estudios epidemiológicos, aunque la mayoría de las cepas se clasifican dentro de un pequeño número de fagotipos, por lo que se hace necesario emplear otras técnicas de epidemiología molecular. El esquema de fagotipado no se utiliza de forma general para otros serogrupos de ECVT diferentes de O157, pero puede servir para mostrar si otros serotipos presentan un patrón de lisis común (Strockbine *et al.* 1988).

Brevemente, el protocolo del fagotipado consiste en:

- Siembra de las cepas en un agar nutritivo. Incubación (18-24 h/37 °C).
- Siembra de un tubo de caldo nutriente con ClNa 0,8% por cada cepa. Incubación en estufa o baño en agitación durante aproximadamente 1h 30 min, o hasta que se alcance una turbidez visible.
- Siembra por inundación de una placa de agar con ClNa al 0,8% por cada cepa que se estudie. Retirar el exceso de sobrenadante. Dejar secar la placa a T^a ambiente.
- Aplicación de los fagos a la dilución de uso siguiendo un orden determinado. Esperar a que se sequen las gotas. Incubación en estufa (18-24 h/37 °C).
- Leer las lisis obtenidas y comparar los resultados con el esquema establecido, asignando el fagotipo correspondiente.

3.6. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizó la caracterización de los genes de virulencia de las cepas, la determinación de los grupos filogenéticos, así como la determinación de aquellos antígenos H que no se podían resolver mediante serotipado por ser cepas no móviles, o por dar reacciones cruzadas. Para ello se utilizaron *primers* (cebadores)

específicos (Tabla 20 a Tabla 24). En todas las reacciones de PCR se incluyeron cepas control de los genes diana (Tabla 18).

En relación a los perfiles de virulencia, las 820 cepas del estudio se analizaron para los genes *vt1*, *vt2*, *eae*, *E-hlyA*, *katP*, *espP*, *subAB* e *iutA* (*iucD* en el caso del serotipo O157:H7/HNM). También se realizó el tipado de intiminas para todas las cepas *eae* positivas y el subtipado de verotoxinas para las cepas *vt* positivas, excepto en el caso del serotipo O157:H7/HNM, de las que se hizo una selección.

A continuación, y en base a sus perfiles de PFGE y los resultados previos, se completó la caracterización en una selección de aproximadamente 500 cepas para los genes *stcE* y *saa*, así como otros genes de interés para serogrupos concretos. Específicamente, las cepas analizadas para todos estos genes fueron:

- Las 15 cepas del serogrupo O5.
- Las 7 cepas del serogrupo O8.
- Las 10 cepas del serogrupo O20.
- Setenta y ocho de las 125 cepas del serogrupo O26. Adicionalmente, todas las cepas de este serogrupo se analizaron para los genes *bfp*, *hlyA*, *cnf* (*cnf1*, *cnf2* y *cnf3*).
- Las 3 cepas del serogrupo O75.
- Dieciocho de las 30 cepas del serogrupo O76.
- Las 12 cepas del serogrupo O77.
- Veintitrés de las 33 cepas del serogrupo O91 se analizaron para *stcE* y *saa*, y las 33 para *subAB*.
- Las 2 cepas del serogrupo O98.
- Las 11 cepas del serogrupo O103.
- Las 12 cepas del serogrupo O104.
- Seis de las 11 cepas del serogrupo O111.
- Diez de las 13 cepas del serogrupo O113.
- Cinco de las 9 cepas del serogrupo O117.
- Siete de las 13 cepas del serogrupo O118.
- Veintiun de las 31 cepas del serogrupo O128 se analizaron para *stcE* y *saa*, y las 31 cepas para *subAB*.
- Las 8 cepas del serogrupo O145.

- Setenta y dos de las 119 cepas del serogrupo O146.
- Las 22 cepas del serogrupo O156.
- Ciento treinta y ocho de las 289 cepas del serogrupo O157. En el caso de este serogrupo se hizo una selección de 113 cepas para el subtipado de las verotoxinas.
- Treinta y dos de las 43 cepas del serogrupo O166.

EXTRACCIÓN DEL ADN

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

MEZCLAS DE REACCIÓN

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

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

AMPLIFICACIÓN

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

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

REVELADO DE LOS RESULTADOS

Los productos amplificados en las pruebas de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Seakem® LE agarose, Lonza) al 2% en tampón TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA), cargando en cada pocillo 12 µl de muestra amplificada. En todos los casos se incluyeron cepas control positivas y negativas. Alternativamente, se incluyó un marcador de pesos moleculares, concretamente el ADN del bacteriófago øX174 cortado con *Hae*III (fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pares de bases) (Promega).

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

SECUENCIACIÓN

En casos concretos, señalados en los apartados correspondientes, la caracterización y tipado de genes se realizó mediante secuenciación de fragmentos de ADN. Asimismo se llevó a cabo mediante secuenciación la determinación de las ST de las cepas. La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación y Análisis de Fragmentos de la RIAIDT en el Campus de Lugo (USC) mediante el método de Sanger. El equipo empleado para este fin fue un analizador genético ABI 3100 (Applied Biosystems) con los reactivos BigDye Terminador v3.1 cycle sequencing kit.

3.6.1. Genes de virulencia

En la Tabla 20 y Tabla 21 se recogen los *primers* empleados para la detección y caracterización de genes asociados típicamente a los patotipos ECVT y ECEP, así como otros genes de virulencia comunes a distintos patotipos.

Tabla 20. *Primers* utilizados en la PCR para la detección y caracterización de genes de virulencia

Nombre del gen	<i>Primers</i>	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	T ^a de hibridación (°C)	Referencia
vt1/vt1	VT1-F	TCGCTGAATGTCATTGCTCTGC	539	55	Mora <i>et al.</i> 2011
	VT1-R	TCAGCAGTCATTACATAAGAAC			
vt2/vt2	VT2-F1	TTTCTTCGGTATCCTATTCCC	358	55	Mora <i>et al.</i> 2011
	VT2-F2	TGTCTTCAGCATCTTATGCAG			
	Vt2-R	CTGCTGTCGGTTGTCATGGAA			
eae	EAE-V3F	CATTGATCAGGATTTTTCTGGT	510	55	Mora <i>et al.</i> 2011
	EAE-MBR	TCCAGAATAATATTGTTATTACG			
O157rfbE	O157-AF	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG	497	55	Desmarchelier <i>et al.</i> 1998
	O157-AR	CATTGGCATCGTGTGGACAG			
E-hlyA	hlyA-1	GGTGCAGCAGAAAAGTTGTAG	1551	62	Schmidt <i>et al.</i> 1995
	hlyA-4	TCTCGCTGATAGTGTGGTA			
saa	Saa-C	CAGATGCTGCTACAGTTGGCCA	790	66	Este estudio Paton y Paton, 2002
	SAADR	ATGGACATGCCTGTGGCAAC			
subAB ^a	SubHCDF	TATGGCTCCCTCATTGC	556	64	Paton y Paton, 2005
	SubSCDR	TATAGCTGTTGCTTCTGACG			
subAB ^b	subAB-V-for	CTTCCCTCATTGCCTCAGC	1066	60	Funk <i>et al.</i> 2013
	subAB-V-rev	GGCTGGCCTGTTGTGAAA			
stcE	stcE-Fw	GGCTCCGAGGTGGGGGAAT	399	64	Bustamante <i>et al.</i> 2011
	stcE-Rv	GAAGCCGGTGGAGGAACGGC			
katP	wkat-B	CTTCTGTTCTGCTGATTCTTCTGG	2125	58	Brunner <i>et al.</i> 1996
	wkat-F	AACTTATTTCTCGCATCATCC			
espP	esp-A	AAACAGCAGGCACTTGAACG	1830	58	Brunner <i>et al.</i> 1999
	esp-B	GGAGTCGTCAGTCAGTAGAT			
terD ^c	TerD1	AGTAAAGCAGCTCCGTCAAT	396	64	Taylor <i>et al.</i> 2002
	TerD2	CCGAACAGCATGGCAGTCT			
terB	TerB1	AGGCCGTGACGAAGTACC	286	70	Taylor <i>et al.</i> 2002
	TerB2	TCGCAACGGCAATACCAACAG			
hlyA	hly f	AACAAGGATAAGCACTGTCTGGCT	1177	58	Yamamoto <i>et al.</i> 1995
	hly r	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA			
iutA	iutA-F	GGCTGGACATCATGGAACTGG	280	62	Johnson <i>et al.</i> 1997
	iutA-R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
iucD	Aer f	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	60	Yamamoto <i>et al.</i> 1995
	Aer r	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG			
pCDV432	pCVD432/start	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630	60	Schmidt <i>et al.</i> 1995
	pCVD432/stop	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT			
aaiC	aaiC-F	TGGTGACTACTTTGATGGACATTGT	313	62	Boisen <i>et al.</i> 2012
	aaiC-R	GAACTCTTCTGGGGTAAACGA			
aggR	aggR-F	GCAATCAGATTAARCAGCGATACA	426	62	Boisen <i>et al.</i> 2012
	aggR-R	CATTCTTGATTGCATAAGGATCTGG			
eltA	LT-A-1	GGCGACAGATTATACCGTGC	696	55	Schultsz <i>et al.</i> 1994
	LT-A-2	CCGAATTCTGTTATATATGTC			
est	STa-A	ATTTTTATTTCTGTATTGTCTTT	176	48	Penteado <i>et al.</i> 2002
	STb-B	GGATTACAACACAGTTCACAGCAGT			
bfp	BFP-NF1	ATGGTTTCTAAAATCATGAATAAG	262	55	Este estudio
	BFP-NR1	ATTATTCGGGAATTGCAGATGTGT			
cnf1	cnf1-f2	CAGGAGGTAAGTAGCAGCGT	468	50	Mora <i>et al.</i> 2013
	cnf1-rc	TAATTTGGGTTTGTATC			
cnf2	cnf2-f2	CAGAAGATACTTAGTAGATA	468	50	Este estudio
	cnf2-rc	TAGTTTTGGGGTCAATT			
cnf3	cnf3-rc	TAATCTTGAGTCCACATA	468	50	Este estudio
	cnf3-f2	AAGGTGATACTTAGTCAGAC			

^aUtilizando los primers de Paton y Paton (2005) detectamos la subtilasa codificada en el plásmido; ^b los primers diseñados por Funk *et al.* (2013) permiten detectar las variantes plasmídica y cromosómica. ^cPrimers utilizados tanto para la detección como para secuenciar el gen *terD*; estos primers se utilizaron para la secuenciación del gen *terD* en aquellos casos en los que la amplificación de PCR resultaba dudosa para dicho gen

Tabla 21. *Primers* utilizados para la tipificación del antígeno H

Gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	T ^a de hibridación (°C)	Referencia
<i>fliC_{H2}</i>	H2-F	AACGACGGCGAAACAATTAC	828	58	Alonso <i>et al.</i> 2017
	H2-R	AGAACGCAACGAGTCAACCT			
<i>fliC_{H4}</i>	<i>fliC</i> -H4-F	GCAGCGTATTCGTGAACTGA	713	66	Mora <i>et al.</i> 2011
	<i>fliC</i> -H4-R	GCTGGATAATCTGCGCTTTC			
<i>fliC_{H7}</i>	<i>fliC_{H7}</i> -F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625	55	Gannon <i>et al.</i> 1997a
	<i>fliC_{H7}</i> -R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC			
<i>fliC_{H8}</i>	H8-F	TAACAGCGCAAAAGACGATG	393	58	Mora <i>et al.</i> 2012a
	H8-R	CCGAGAGTTTTTCGCATCAAT			
<i>fliC_{H10}</i>	H10-F	AGCAAGTGGCAGTAGGTGCT	624	62	Alonso <i>et al.</i> 2017
	H10-R	GCTGGATAATCTGCGCTTTC			
<i>fliC_{H11}</i>	<i>fliCRH11</i> -1	ACTGTTAACGTAGATAGC	248	54	Durso <i>et al.</i> 2005a
	<i>fliCRH11</i> -2	TCAATTTCTGCAGAATATAAC			
<i>fliC_{H21}</i>	H21-F	GGCGATTGCTAACCGTTTTTA	549-556	58	Mora <i>et al.</i> 2012a
	H21-R	CGTAAGTGAACCATCCGCAG			
<i>fliC_{H25}</i>	H25-F	ATGAAATTGACCGCGTATCC	212	58	Alonso <i>et al.</i> 2017
	H25-R	TTGCGGGATAGATGTGATAGC			
<i>fliC_{H28}</i>	H28-F	ACGAAATCAAATCCCCTCTG	856	66	Mora <i>et al.</i> 2012a
	H28-R	GCCGATTGAAGAGACTCAGC			
<i>fliC</i>	<i>FliC</i> -F ^a	CCGAATTCATGGCACAAGTCATTAATAC	1771	50	Gannon <i>et al.</i> 1997a
	<i>FliC</i> -R ^a	CCGAATTCCTAACCTGCAGTAGAGACA			

Los antígenos H determinados mediante PCR se identifican en corchetes []
^aPrimers utilizados para la secuenciación del antígeno H

3.6.2. Tipado de verotoxinas

Para el tipado y subtipado de las verotoxinas se utilizó el protocolo y la nomenclatura estandarizada propuesta por Scheutz *et al.* (2012). Este protocolo permite mediante PCR la identificación de 3 subtipos de *vt1* (*vt1a*, *vt1c* y *vt1d*) y 7 subtipos *vt2* (*vt2a*, *vt2b*, *vt2c*, *vt2d*, *vt2e*, *vt2f* y *vt2g*) (Tabla 22).

Tabla 22 . *Primers* utilizados para la detección y tipado de *vt* (Scheutz *et al.* 2012)

Genes, uso primer, y primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Posición	Tamaño (pb)	Comentarios
vt y vt1				
Secuenciación				
stx1-seq-F1	ATGTCATTGCTCTGCAATAGGTAC	119-143	1.020	
stx1-seq-R1	GAAGAAGAGACTGAAGATTCCATCTG	1.113-1.138		
Detección				
stx1-det-F1	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC	440-462	209	
stx1-det-R1	AGCAGTCATTACATAAGAACGYCCACT	622-648		

Genes, uso primer, y primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Posición	Tamaño (pb)	Comentarios
Subtipado				
stx1a-F1	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	362-384	478	Los 6 primers pueden ser utilizados en una PCR triple para el subtipado de la verotoxina VT1
stx1a-R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	815-839		
stx1c-F1	CCTTTCCCTGGTACAACCTGCGGTT	362-384	252	
stx1c-R1	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA	588-613		
stx1d-F1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	50-78	203	
stx1d-R2	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA	225-252		
vt2				
Secuenciación y detección				
F4	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT	606-629	627	Para la detección se pueden utilizar los 4 primers en una reacción; para la secuenciación, utilizar F4 y R1 para todos los subtipos excepto vt2e y vt2f, que son secuenciados con F4-f y R1-e/f
R1	ATTAAGTGCACCTCAGCAAATCC	1.209-1.232	625	
F4-f	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT	606-629		
R1-e/f	TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC	1.209-1.230		
Subtipado				
stx2a-F2	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	754-774	349	
stx2a-R3	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG	1.079-1.102		
stx2a-R2	GCCACCTTCACTGTGAATGTG	1.079-1.100	347	
stx2b-F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	968-994	251	
stx2b-R1	CAGCAAATCCTGAACCTGACG	1.198-1.218		
stx2c-F1	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	926-955	177	
stx2c-R2	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	1.079-1.102	179	
stx2d-F1	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	927-955		
stx2d-R1	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	1.085-1.105	235	
stx2d-O55-R	TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG	1.140-1.161		
stx2d-R2	GCCTGATGCACAGGACTGGAC	1.184-1.206	280	
stx2e-F1	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	695-713	411	
stx2e-R2	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	1.080-1.105		
stx2f-F1	TGGGCGTCATTCCTGTTG	451-475	424	
stx2f-R1	TAATGGCCGCCCTGTCTCC	856-874		
stx2g-F1	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	203-231	573	
stx2g-R1	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	771-793		

Las condiciones de PCR serían las siguientes:

- Inoculación de una única colonia en caldo TSB e incubación 18-24h/37 °C.
- Traspaso de 100 µl de caldo a un tubo eppendorf. Se añaden 900 µl de H₂O estéril y se colocan en un bloque de calentamiento a 100°C durante 15 min. Posteriormente se centrifugan a 18.000 xg durante 5 min.
- Traspaso a un tubo eppendorf nuevo. El sobrenadante se utiliza directamente para la PCR y el restante se almacena a -18 °C para análisis posteriores.
- La PCR se prepara para un volumen total de 20µl que contiene: 2,5 µl H₂O, 10 µl del Kit HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 1,25 µl de cada uno de los 2 cebadores (la solución madre de los cebadores a 5 µM) y 5 µl del sobrenadante.
- Si se utilizan 3 cebadores (vt2a), el volumen de H₂O se reduce a 1,25 µl; si se utilizan 4 (vt2d o para la detección de todas las variantes de vt2), no se añade H₂O.
- Las condiciones del termociclador fueron: 95 °C durante 15 min seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 50 s, 56 °C para la secuenciación y detección, y 64-66 °C para la subtipificación durante 40 s y 72 °C durante 60 s, terminando con 72 °C durante 3 min.
- Los productos de PCR se almacenan a 4 °C.
- La PCR triple para la subtipificación de vt1 se prepara para un volumen total de 25 µl que contiene: 12 µl de Mastermix (HotStarTaq, Qiagen), 1 µl de cada uno de los 4 cebadores para vt1c y vt1d (solución madre de los cebadores a 5 µM), 2 µl de cada uno de los 2 cebadores para vt1a (solución madre de cebadores a 5 µM) y 5 µl del sobrenadante de la muestra.
- En el caso de la variante VT2d, los 3 primers reverso en la misma reacción provocará la aparición de amplicones de 179 pb en 9 variantes de vt2d, 235 pb en la variante vt2d-O55-5905, 280 pb en 5 variantes de vt2d, y finalmente 2 amplicones de 179 pb y 280 pb en la variante vt2d -O73-C165-02.

3.6.3. Tipado de intiminas

Para el tipado de intiminas se utilizó el protocolo desarrollado en el LREC (Blanco *et al.* 2006a,b). Este protocolo permite mediante PCR y secuenciación la identificación de los tipos y subtipos de intiminas mostrados en la Tabla 23.

Tabla 23. *Primers* utilizados para la detección y tipado de *eae*

Gen	Primer	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	T ^a °C	Posición del primer	Accession number	Referencia
<i>eae</i> ^a	^a EAE-V3F	CATTGATCAGATTTTTCTGGT	510	55	831-852 1318-1340	AF022236	Mora <i>et al.</i> 2011
	^a EAE-MBR	TCCAGAATAATATTGTTATTACG					
<i>eae</i> - α 1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	820	60	1909-1928 2709-2728	AF022236	Blanco <i>et al.</i> 2004
	EAE-A	CACTCTTCGCATCTTGAGCT					
<i>eae</i> - α 2	IH2498aF	AGACCTTAGGTACATTAAGTAAGC	517	60	2099-2122 2597-2615	AF530555	Blanco <i>et al.</i> 2004
	IH2498aR	TCCTGAGAAGAGGGTAATC					
<i>eae</i> - β 1	B1F	CACAATTAATGCACCGGGT	241	55	2499-2517 2720-2739	AF453441	Blanco <i>et al.</i> 2006b
	B1R	GCTTGATACACCTGATGACT					
<i>eae</i> - β 2B	B2F	TGAAGGGGGAAACCCCTGTG	564	62	2054-2073 2596-2617	AF530556 AJ715407	Blanco <i>et al.</i> 2006b
	B2R	TTTCTTTTGACTGTGCTAAAGC					
<i>eae</i> - δ/κ ^b	EAE-FN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	669	50	1891-1913 2542-2559	U66102	Este estudio
	EAE-DB	ATATGTCATCCGATTAAT					
<i>eae</i> - β 3	42584F	AAGCGGATAACGCTGATACC	950	52	1712-1731 2641-2661	AJ876653 AJ876654	Este estudio
	EAE-RB2	ATATTTATTAGCAGCTCCCA					
<i>eae</i> - γ 1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	804	60	1909-1928 2691-2712	AF071034	Blanco <i>et al.</i> 2004
	EAE-C1	AGAACGCTGCTCACTAGATGTC					
<i>eae</i> - θ/γ 2 ^b	EAE-C2F	AGAACGTTACTGGTGACTTA	414	58	2303-2322 2697-2716	AF025311	Blanco <i>et al.</i> 2006b
	EAE-C2R	CTGATATTTTATCAGCTTCA					
<i>eae</i> - ϵ 1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	722	66	1909-1928 2605-2629	AF116899	Blanco <i>et al.</i> 2004
	EAE-LP5	AGCTCACTCGTAGATGACGGCAAGCG					
<i>eae</i> - ν R/ ϵ 2	EAE-E2F	AATACAGAAGTTAAGGCAT	378	58	2230-2248 2590-2607	AF530554	Blanco <i>et al.</i> 2006b
	EAE-E2R	ACGACCACTATTCATTTTC					
<i>eae</i> - ϵ 3	EAE-FN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	783	60	1891-1913 2655-2673	AJ876649 AJ876650	Este estudio
	31923R	CTCATAACGATTAGCTGCC					
<i>eae</i> - ϵ 4	37159F	GGCATAGAAGCTATTACC	951	50	1720-1737 2650-2670	AJ876651	Este estudio
	EAE-RB3	ATAACTATTGGCAGCGCCCA					
<i>eae</i> - ζ	Z1	GGTAAGCCGTTATCTGCC	206	62	2062-2079 2250-2267	AF449417	Blanco <i>et al.</i> 2004
	Z2	ATAGCAAGTGGGGTGAAG					
<i>eae</i> - η 1/ η 2	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	702	60	1909-1928 2592-2610	AJ308550	Blanco M. <i>et al.</i> 2006b
	ETA-B	TAAGCGACCACTATTCGTG					
<i>eae</i> - η 1	ETA-FN	CGCTTTGTTTAAATGCCGATAAA	410	62	1074-1095 1467-1483	AJ308550	Blanco <i>et al.</i> 2006b
	ETA-RN	GACTGCGTAATGCACTG					
<i>eae</i> - η 2	ETA2-F1	TGCTTTGTTTAAATCTGATAAG	410	52	1074-1095 1467-1483	AJ879898	Este estudio
	ETA2-R1	GGCTACGTAATGAACTA					
<i>eae</i> - ι 1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	651	55	1909-1928 2538-2559	AJ308551	Blanco <i>et al.</i> 2006b
	IOTA-B	GTCATATTTAACTTTTACACTA					
<i>eae</i> - ι 2	lota2-F	CTGGTAAAGCGATAGTCAAAC	936	58	1850-1870 2763-2785	AF530553	Blanco <i>et al.</i> 2006b
	lota2-R	CGCTTTTGAAGAAACATTTTGC					
<i>eae</i> - λ	68.4F	ATGTAACGTTTTTAAACAACCTGC	389	55	2084-2105 2452-2472	AJ715409	Este estudio
	68.4R	TACAACCTTAATAACAGCCTC					
<i>eae</i> - μ B	EAE-FN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	710	52	1891-1913 2581-2600	AJ705049	Este estudio
	MICRA2	TGTGAGGATGGCAGAGAGCC					
<i>eae</i> - ν B	IH1229aF	CACAGCTTACAATTGATAACA	311	60	2255-2275 2545-2565	AJ705050	Blanco <i>et al.</i> 2006b
	IH1229aR	CTCACTATAAGTCATACGACT					
<i>eae</i> - ξ B	EAE-FN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	739	64	1891-1913 2604-2629	AJ705051	Este estudio
	B49RN	ACTCATTCTAGATAGCGGTAACCGG					
<i>eae</i> - \omicron	H2997fF	AGCGTTAGCAATGCCGAGTTGAT	271	60	2203-2226 2454-2473	AJ876647 AJ876648	Blanco <i>et al.</i> 2006b
	IH2997fR	CAACGGTAATTGTTGTTTCC					
<i>eae</i> - π	1015F	GAACCTTGGTAAGTTGGAT	479	55	2100-2118 2561-2578	AJ705052	Este estudio
	1015R	CAGCAGAGCTATAGATT					
<i>eae</i> - ρ	4794F	TAACAACAGGGAACGACGGACGC	302	66	2141-2163 2421-2442	AJ748082 AJ748083	Este estudio
	4794R	TAGTCCTGTAGTTGACTCCACG					
<i>eae</i> - σ	Sigma-F	GCTCAAGCACAAACTGCAAT	649	52	2125-2144 2756-2773	AJ781125	Este estudio
	Sigma-R	CTACATTAACATCAGAAC					
<i>eae</i> ^c	^b EAE-FBN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	1125	55			Alonso <i>et al.</i> 2017
	^b EAE-R11	TCTTCGGAGGGTTTTTATT					
<i>eae</i> ^c	^b EAE-FBN	CAGGTCGTCGTCTGCTAAAAC	1181	55			Alonso <i>et al.</i> 2017
	^b EAE-R12	CCAGACGAATATATACATATTC					

^aPrimers universales empleados para amplificar la región conservada 5' común a todos los alelos del gen *eae*, por lo que permiten detectar todas las variedades. ^bDebido a que las secuencias nucleotídicas de las variedades (γ 2 y θ) y (δ y κ) son casi idénticas (99% y 98% homología en la región variable, respectivamente), es necesario realizar su diferenciación mediante secuenciación. ^cPrimers específicos de la región 3' variable de gen *eae*.

3.6.4. Determinación de grupos filogenéticos

Actualmente están reconocidos 8 filogrupos de *E. coli*, 7 pertenecientes a *E. coli sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E, F) y uno correspondiente a *Escherichia* clade I (Luo *et al.* 2011; Clermont *et al.* 2013). La asignación de filogrupos se llevó a cabo mediante PCR siguiendo el método descrito por Clermont *et al.* (2000; 2013) (Tabla 24). El procedimiento se basa en la determinación de presencia/ausencia de 6 marcadores genéticos, tal y como se refleja en la Tabla 25.

Tabla 24. *Primers* utilizados para la identificación de los grupos filogenéticos

Región Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	T ^a de hibridación (°C)	Referencia	
<i>chuA</i>	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	62	Clermont <i>et al.</i> 2000	
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				
<i>yjaA</i>	YjaA.1	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	211	54		
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC				
TSPE4.C2	TspE4.C2.1	GAGTAATGTGGGGCATTCA	152	54		
	TspE4.C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG				
<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	62		Clermont <i>et al.</i> 2013
	ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA				
<i>arpA</i> (filogrupo E)	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAAATATGCC	301	57		Lescat <i>et al.</i> 2013
	ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCTCAAGAG				
<i>trpA</i> (filogrupo C)	trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCAGAG	219	56	Lescat <i>et al.</i> 2013	
	trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCC				

Tabla 25. Asignación de grupo filogenético en base a los resultados de PCR

Grupo filogenético	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2	<i>arpA</i>	<i>trpA-C</i>	<i>arpA-E</i>
A	-	-	-	+	-	-
A	-	+	-	+	-	-
B1	-	-	+	+	-	-
B2	+	+	+ / -	-	-	-
B2	+	-	+	-	-	-
C	-	+	-	+	+	-
D	+	-	+ / -	+	-	-
E	+	-	+ / -	+	-	+
E	+	+	-	+	-	+
F	+	-	-	-	-	-

3.7. MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

La técnica de tipado de secuencias multilocus (MLST) se ha revelado como una herramienta de tipado filogenético fundamental, tanto para estudios de evolución como epidemiológicos globales. Esta técnica utiliza las secuencias de fragmentos internos amplificados por PCR de genes altamente conservados que definen el perfil alélico o secuencia tipo (ST) para cada cepa. Siguiendo el esquema de MLST de Achtman (Wirth *et al.* 2006) se utilizaron los primers especificados en la Tabla 26 para los genes *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*.

Tabla 26. Genes diana y primers utilizados en MLST según el esquema de Achtman

Gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)	T ^a de hibridación (°C)
<i>adk</i> (adenylate kinase)	adkF	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	975	56
	adkR	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>fumC</i> (fumarate hydratase)	fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	56
	fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>gyrB</i> (DNA gyrase)	gyrBF	TCGGCGACACGGATGACGGC	911	56
	gyrBR	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>icd</i> (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase)	icdF	ATGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878	56
	icdR	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdh</i> (malate dehydrogenase)	mdhF	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG	932	66
	mdhR	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT		
<i>purA</i> (adenylosuccinate dehydrogenase)	purAF	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	56
	purAR	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>recA</i> (ATP/GTP binding motif)	recAR1	AGCGTGAAGGTAACCTGTG	780	56
	recAF1	ACCTTTGTAGCTGTACCAG		

Las secuencias obtenidas se editaron y revisaron utilizando el programa BioEdit (Carlsbad, CA), version 7.0.1. Se igualaron los tamaños de fragmento mediante comparación con los templados alélicos de la cepa de *E. coli* MG1655 proporcionados por la página web (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>), obteniéndose a través de la base de datos de dicho portal, las combinaciones alélicas de los 7 genes y las secuencias tipo correspondientes. Aquellas secuencias nucleotídicas o combinaciones alélicas nuevas que no figuraban en la base de datos, se remitieron al responsable de la misma para que le asignara una nueva identificación alélica, o ST, respectivamente. También se obtuvieron las asignaciones a los complejos ST (ST Cplx), que de acuerdo con la modificación de la base MLST (17.05.2007) son grupos de al menos 3 ST que comparten 6 alelos en las comparaciones por pares (*pair-wise comparisons*).

3.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MEDIANTE EL ALGORITMO NEIGHBOR-JOINING

Para analizar las relaciones evolutivas entre las cepas y la consistencia de las asignaciones de filogrupo obtenidas mediante PCR, construimos un árbol filogenético basado en las secuencias concatenadas de los 7 genes del esquema de MLST de Achtman mediante el programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versión 6.0, utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987).

3.9. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MEDIANTE EL ALGORITMO eBURST

El algoritmo BURST (based upon related sequence types = basada en tipos de secuencias relacionadas) se centra en la identificación de grupos de cepas estrechamente relacionadas dentro de una población bacteriana, para las que se presupone un ancestro común reciente (complejo clonal), y en conocer cómo emergieron y se diversificaron (Feil *et al.* 2004).

Por tanto, este algoritmo permite generar grupos que reflejan las relaciones entre las ST de una población, y compararlos con una base de datos MLST; predice el genotipo fundador (ancestro) para cada complejo clonal; y calcula el valor *bootstrap* para cada asignación (Spratt *et al.* 2004).

En el presente estudio analizamos mediante el algoritmo eBURST V3 (<http://www.eburst.mlst.net/>) los resultados de MLST obtenidos para nuestras cepas, junto con la base completa MLST de *E. coli* obtenida a través de la página web http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/GetTableInfo_html, que a fecha de marzo 2016 incluía 4.910 ST y 56 complejos ST (ST Cplx). Para el análisis se aplicó el criterio más conservador, de manera que los datos de MLST fueron subdivididos en grupos no solapantes de ST relacionadas o Complejos Clonales (CC), compartiendo todos los miembros de un mismo grupo alelos idénticos en ≥ 6 de los 7 loci con al menos otro miembro del grupo. El genotipo fundador (ancestro) de cada CC quedó identificado como aquel dentro del grupo con el mayor número de variantes en un único locus = single locus variants (SLVs) relacionados. En algunos casos, un SLV del fundador primario puede diversificar para producir múltiples SLV y se identifica como un fundador de un subgrupo (Feil *et al.* 2004).

3.10. PERFILES DE MACRORRESTRICCIÓN OBTENIDOS MEDIANTE PFGE

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

análisis de perfiles de macrorrestricción obtenidos con enzimas de restricción (en nuestro caso utilizamos XbaI), que cortan de manera infrecuente el ADN cromosómico para generar grandes fragmentos de ADN (mayores de 40 kb), que no se podrían separar mediante electroforesis convencional, por lo que, para conseguirlo se alterna cíclicamente la orientación del campo eléctrico durante el proceso electroforético (PFGE) (Figura 17).

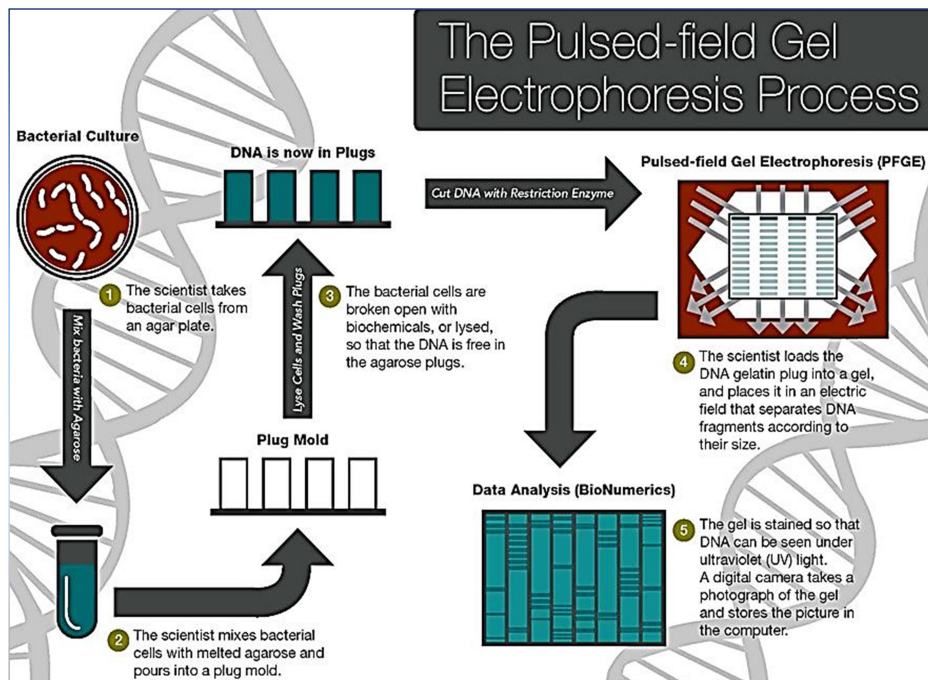


Figura 17. Esquema de la técnica de PFGE.

Fuente: <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html#pfge>

Para el análisis de los perfiles de macrorrestricción obtenidos con XbaI se utilizó el programa BioNumerics version 5.0. (Applied Maths, Sint-Martens-Latem) para generar dendrogramas mediante el método de UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) utilizando medias aritméticas, y aplicando el coeficiente de similitud Dice con un nivel de tolerancia en la posición de bandas del 1,0%. Mediante esta metodología, se consideró que las cepas comparadas estaban próximamente relacionadas (alto grado de similitud), y definían un cluster, si el valor del coeficiente Dice era $\geq 85\%$, en concordancia con el criterio definido por Tenover (≤ 6 bandas de diferencia) (Tenover, 1997).

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

LISIS CELULAR

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

DIGESTIÓN DEL ADN

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

- Preincubación: termobloque a 37 °C, 15 min en 200 µl del buffer H 10X diluido en agua bidestilada. Pasado ese tiempo retiramos el buffer de preincubación y añadimos la enzima.
- Incubación: termobloque a 37 °C, 180 min en 200 µl de la enzima XbaI (10 U/µl por muestra) diluida en buffer H.

ELECTROFORESIS

Una vez terminada la digestión, montar los cortes de bloque sobre los 15 dientes del peine para la electroforesis, incluyendo la cepa control Salmonella Braenderup en las posiciones 1, 8 y 15. Preparar el gel con 150 ml de agarosa SeakemGold al 1% en TBE 0,5X. Atemperar la agarosa a 55 °C antes de añadirla al molde en el que se ha colocado el peine.

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

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

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

REVELADO DEL GEL

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

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En base a los datos reflejados en la literatura científica, y a los propios resultados del LREC (brevemente expuestos a continuación), se seleccionaron para el presente estudio 820 cepas, en su mayoría *vt* positivas, aisladas de diferentes fuentes de aislamiento en España entre los años 1980 y 2011. El criterio de selección se estableció en base a sus serotipos, de manera que se incluyeron fundamentalmente aquellos más frecuentemente identificados en aislamientos clínicos humanos, con el objetivo general de la caracterización molecular y el análisis estructural de una colección representativa de cepas de ECVT, o EPEC filogenéticamente relacionadas.

Las cepas de ECVT que causan infecciones en el hombre pertenecen a un amplísimo número de serotipos O:H, pero dentro de las no O157, son O26:H11, O26:HNM, O91:H21, O91:H14, O91:HNM, O103:H2, O103:H25, O111:H8, O113:H21, O117:H7, O118:H16, O121:H19, O128:H2, O128:HNM, O145:H28, O145:HNM y O146:H21 los serotipos que se detectan con mayor frecuencia a nivel mundial, y que junto con el O157, son los más habitualmente asociados a procesos clínicos graves en los seres humanos (Karmali, 1989; Johnson *et al.* 1996; Slutsker *et al.* 1997; Keskimäki *et al.* 1998; Beutin, 1999; Boerlin *et al.* 1999; Banatvala *et al.* 2001; Blanco *et al.* 2001; Eklund *et al.* 2001; Kehl, 2002; Mora, 2002; Parck *et al.* 2002; Blanco *et al.* 2004; Mora *et al.* 2007a; Vally *et al.* 2012; Gould *et al.* 2013; Brandal *et al.* 2015; Fruth *et al.* 2015).

Los serotipos que se identifican en España son similares a los de otros países. En nuestra área sanitaria, el LREC llevó a cabo un estudio entre los años 1992 a 2011, en colaboración con el Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) de Lugo, en el que se procesaron para ECVT 13.962 coprocultivos de pacientes internos y externos de todas las edades, la mayoría con cuadros de gastroenteritis y diarrea. Sesenta y tres (0,5%) de los coprocultivos fueron positivos para el aislamiento de ECVT O157 y 251 (1,8%) para ECVT no O157. Entre los no O157, el serotipo O26:H11 fue el más prevalente (Blanco *et al.* 2004; Mora *et al.* 2011). Este serotipo es también uno de los más frecuentemente detectados entre las cepas de ECVT no O157 aisladas de casos clínicos humanos en Alemania (Beutin *et al.* 1994; Karch *et al.* 1997), Bélgica (Piérard *et al.* 1997a), Finlandia (Eklund *et al.* 2001), Canadá (Pai *et al.* 1988; Mackenzie *et al.* 1998) y EE.UU. (Fey *et al.* 2000; Parck *et al.* 2002). En otro estudio realizado por el LREC entre los años 2005 y 2011 con el Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela (CHUS), en el que se analizaron un total de 1.479 coprocultivos, en su mayoría asociados a diarrea sanguinolenta, se asociaron 13 (0,9%) casos con ECVT O157 y 16 (1,1%) con no O157. En dicho estudio, el serotipo O146:H21 fue el más frecuentemente determinado

entre los ECVT no O157, asociado a procesos diarreicos de carácter leve/moderado (Mora *et al.* 2011).

Entre las cepas de ECVT aisladas del ganado bovino los serogrupos más frecuentes son O2, O4, O8, O20, O22, O26, O77, O91, O105, O113, O116, O157, O171, O174 y O177, y específicamente los serotipos O4:H4, O20:H19, O22:H8, O26:H11, O77:H41, O105:H18, O113:H21 y O157:H7 (Blanco *et al.* 1996; 2004c), algunos de los cuales (O20:H19, O26:H11, O113:H21 y O157:H7) se identifican comúnmente entre las cepas ECVT que causan infecciones en humanos. Johnson *et al.* (1996) en Canadá, Pradel *et al.* (2000) en Francia, Beutin *et al.* (1993) y Montenegro *et al.* (1990) en Alemania, Wells *et al.* (1991) en los EE.UU., y Parma *et al.* (2000) en Argentina también han encontrado que muchos ECVT aislados de bovino pertenecen a serotipos previamente asociados con enfermedades humanas.

En cuanto al ganado ovino, los serotipos más frecuentemente detectados en las cepas de ECVT aisladas de estos animales en diferentes países son O5:HNM, O76:H19, O91:HNM, O117:HNM, O128:H2, O146:H8, O146:H21, O157:H7, O166:H28 (Beutin *et al.* 1993; Kudva *et al.* 1996, 1997; McCluskey *et al.* 1999; Blanco *et al.* 2001; Djordjevic *et al.* 2001). La mayoría de estos serotipos también han sido identificados en cepas que causan enfermedades en humanos (Beutin *et al.* 1993, 1997b; Kudva *et al.* 1997; McCluskey *et al.* 1999). Mientras que en el ganado caprino serían O5:HNM y O166:H28 los más frecuentes (Beutin *et al.* 1993; Blanco *et al.* 2003).

Los animales silvestres también son portadores de cepas ECVT, y los serotipos más frecuentemente reportados son O5:HNM, O8:H10, O26:H11, O76:H19, O128:H2, O145:H28, O146:H21 y O157:H7 (Fukuyama *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 2010a,b), con algunos de ellos también compartidos con los más habituales en patología en humanos (O26:H11, O145:H28 y O157:H7). En un estudio realizado por Mora *et al.* (2012a) encontraron que el 14% de los animales silvestres muestreados en Galicia portaba cepas de ECVT que compartían serotipo, filogrupo, tipo de intimina y subtipos *vt* con aislados clínicos humanos de la misma área geográfica y, concretamente, detectaron cepas de los serotipos O5:HNM, O26:[H11], O76:H19, O145:[H28], O146:H21 y O157:H7 con una similitud >85% en sus perfiles de macrorrestricción con cepas ECVT de origen humano. En dicho trabajo también se indicaba que el serotipo O146:H21, uno de los más prevalentes en casos de diarrea en pacientes del sistema sanitario de Galicia (Mora *et al.* 2011), y además identificado frecuentemente en cepas de ECVT aisladas en diferentes alimentos (carne picada, vegetales y productos lácteos) en el LREC, era asimismo el serotipo más frecuentemente determinado en las cepas ECVT aisladas de zorro, lobo o jabalí (Mora *et al.* 2011, 2012a; Herrera, 2015).

En España también se aíslan de alimentos cepas de ECVT no O157 con mayor frecuencia que las O157. El estudio llevado a cabo en el LREC entre los años 1995-2003 (Mora *et al.* 2007a) sobre 785 muestras de carne picada de vacuno, determinó que la mayoría de las cepas

ECVT aisladas (68%) pertenecían a serotipos previamente detectados en cepas ECVT de origen humano, y que el 38% de los serotipos (O5:HNM, O8:H21, O22:H8, O26:H11, O26:HNM, O76:H7, O91:HNM, O103:H2, O103:HNM, O111:HNM, O112:H2, O113:H21, O118:H16, O145:HNM, O157:H7, O174:H21, O174:HNM, ONT:H4, ONT:HNM) habían sido descritos en cepas aisladas de pacientes con SUH.

4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y DETECCIÓN DE GENES *terB/terD*

Genéricamente, el grupo de los ECVT O157 se caracteriza por su capacidad para crecer en presencia de telurito a unas concentraciones en las que otras cepas de *E. coli* no son capaces de crecer, y también por su incapacidad para fermentar el sorbitol (Zadik *et al.* 1993; Taylor *et al.* 2002; Orth *et al.* 2007). Ambas características se utilizaron para el desarrollo de medios como el MacConkey sorbitol con telurito y cefixima que ayudan a su identificación microbiológica (Onoue *et al.* 1999; Van Duynhoven *et al.* 2002). Otra característica de los ECVT O157 es que no producen β -glucuronidasa, lo que también facilita su diferenciación en relación al resto de ECVT no O157. Las 820 cepas del presente estudio se sembraron en los medios MACL, MACS, MACSTC y en Chromocult® (Merck) con objeto de conocer sus características fenotípicas; además, las 820 cepas se analizaron por PCR para la presencia de los genes *terB/terD* de resistencia al telurito (Tabla 27) y, en los casos en los que el resultado de la PCR no era claro, se confirmaba el resultado mediante secuenciación.

El 100% de las cepas de ECVT O157 de este estudio resultaron sorbitol negativas, mientras que la mayoría de las cepas ECVT no O157 (509/531; 95,6%) eran fermentadoras del sorbitol. A pesar de que en 1988 se identificaron por primera vez en el sur de Alemania cepas de ECVT O157 capaces de fermentar el sorbitol, y posteriormente han emergido como importantes patógenos humanos en Europa (Ammon *et al.* 1999; Karch *et al.* 2001; Alpers *et al.* 2009; Werber *et al.* 2011), nosotros no las hemos identificado nunca en España. Además de las 289 cepas ECVT O157, las otras 22 cepas no fermentadoras de sorbitol identificadas en este estudio pertenecieron a los serotipos O26:[H11] (3 cepas), O75:[H8] (2 cepas), O104:H7 (4 cepas), O128:[H2] (1 cepas), O146:[H21] (5 cepas) y O156:[H25] (7 cepas) (Tabla 27).

En cuanto a la producción de la β -glucuronidasa, el 100% de las cepas de ECVT O157 fueron negativas para la producción de esta enzima, frente a solo el 3% de las no O157. Por último, el 77% de las cepas analizadas (632/820) crecieron en presencia de telurito, y este resultado presentó una buena correlación con la detección de los genes *terB/terD* con pocas excepciones (13 cepas *terB/terD* negativas capaces de crecer en MACSTC y 8 cepas positivas genotípicamente, pero que no crecían en el medio). Constatamos que las cepas de los serotipos O26:[H11]/HNM, O75:[H8], O103:[H2], O104:H7/H21, O111:[H8], O117:HNM, O118:H16/HNM, O121:H19, O145:[H28], O146:[H21], O146:[H28] y O157:[H7] son típicamente resistentes al telurito (>90% de las cepas de dichos serotipos resultaron resistentes genotípica y fenotípicamente). Por el contrario, las cepas de los serotipos O8:H2, O76:H19,

O91:[H21], O128:[H2] y O156:[H10] son característicamente sensibles al telurito (>90% de las cepas de dichos serotipos resultaron negativas genotípica y fenotípicamente a la prueba) (Tabla 27).

Tabla 27. Caracterización fenotípica de las 820 de ECVT analizadas en este estudio y detección de los genes *terB/terD* de resistencia al telurito

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d <i>terB</i> / <i>terD</i>	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
IH28275/06A	O5:HNM	H	+	+	+	+
IH39114/07F	O5:HNM	H	+	+	+	+
CP144-6-28	O5:HNM	CV	+	+	+	+
Z-237	O5:HNM	S (zorro)	+	+	+	+
FV5246	O5:HNM	C	-	-	+	+
VTO-124	O5:HNM	O	-	-	+	+
FV5241	O5:HNM	C	-	-	+	+
VTO-35	O5:HNM	O	-	-	+	+
FV5244	O5:HNM	C	-	-	+	+
IH28962/07C	O5:HNM	H	+	+	+	+
VTO-449	O5:HNM	O	-	-	+	+
FV5247	O5:HNM	C	-	-	+	+
FV5238	O5:HNM	C	-	-	+	+
VTO-78	O5:HNM	O	-	-	+	+
FV5249	O5:HNM	C	+	+	+	+
VTB-198	O8:H2	B	-	-	+	+
VTB-27	O8:H2	B	-	-	+	+
VTB-43	O8:H2	B	-	-	+	+
VTB-45	O8:H2	B	-	-	+	+
VTB-44	O8:H2	B	-	-	+	+
VTB-20	O8:H2	B	-	-	+	+
VTB-360	O8:H2	B	-	-	+	+
VTH-61	O20:H19	H	+	+	+	+
VTB-334	O20:H19	B	-	+	+	+
VTB-51	O20:H19	B	-	+	+	+
VTB-129	O20:H19	B	-	-	+	+
VTB-183	O20:H19	B	-	-	+	+
VTB-212	O20:H19	B	-	-	+	+
VTB-252	O20:H19	B	-	-	+	+
VTB-307	O20:H19	B	-	-	+	+
VTB-364	O20:H19	B	-	-	+	+
VTB-336	O20:H19	B	-	-	+	+
O26/1	O26:H11	L	+	+	+	+
O26/2	O26:H11	L	+	+	+	+
O26/3	O26:H11	L	+	+	+	+
O26/4	O26:H11	L	+	+	+	+
O26/5	O26:H11	L	+	+	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
026/6	O26:H11	CV	+	+	+	-
026/7	O26:H11	H	+	+	+	+
026/8	O26:H11	H	+	+	+	+
026/9	O26:H11	H	+	+	+	+
026/10	O26:H11	H	+	+	+	+
026/11	O26:H11	H	+	+	+	+
026/12	O26:[H11]	H	+	+	+	+
026/13	O26:[H11]	H	+	+	+	+
026/14	O26:H11	H	+	+	+	+
026/15	O26:H11	H	+	+	+	+
026/16	O26:H11	B	+	+	+	+
026/17	O26:H11	B	+	+	+	+
026/18	O26:H11	B	+	+	+	+
026/20	O26:H11	B	+	+	+	+
026/21	O26:H11	B	+	+	+	+
026/22	O26:H11	B*	+	+	+	+
026/23	O26:H11	B*	-	-	+	+
026/24	O26:H11	B*	+	+	+	+
026/26	O26:H11	B*	+	+	+	+
026/27	O26:H11	B*	+	+	+	+
026/28	O26:H11	B*	+	+	+	-
026/29	O26:H11	B*	+	+	+	+
026/30	O26:H11	B	+	+	+	+
026/33	O26:H11	B	+	+	+	+
026/34	O26:H11	B	+	+	+	+
026/35	O26:H11	B	+	+	+	+
026/36	O26:H11	B	+	+	+	+
026/37	O26:H11	B	+	+	-	+
026/38	O26:H11	B	+	+	+	+
026/39	O26:H11	B	+	+	+	+
026/40	O26:H11	B	+	+	-	+
026/41	O26:H11	CV	+	+	+	+
026/43	O26:H11	H	+	+	+	+
026/44	O26:H11	H	-	-	+	+
026/45	O26:H11	H	+	+	+	+
026/46	O26:H11	H	+	+	+	+
026/47	O26:H11	H	+	+	+	+
026/48	O26:H11	H	+	+	+	+
026/49	O26:H11	H	+	+	+	+
026/50	O26:H11	H	+	+	+	+
026/51	O26:H11	H	+	+	+	+
026/52	O26:H11	H	+	+	+	+
026/53	O26:H11	H	+	+	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
026/54	O26:[H11]	H	+	+	+	+
026/55	O26:H11	H	+	+	+	+
026/56	O26:H11	H	+	+	+	+
026/64	O26:H11	O	-	-	+	+
026/68	O26:HNM	H	+	+	+	-
026/69	O26:H11	H	+	+	+	+
026/70	O26:HNM	H	+	+	+	-
026/71	O26:HNM	H	+	+	+	-
026/72	O26:H11	H	+	+	+	+
026/73	O26:[H11]	H	+	+	+	+
026/74	O26:H11	H	+	+	+	+
026/76	O26:[H11]	H	+	+	+	+
026/78	O26:H11	H	-	-	+	+
026/82	O26:H11	B	+	+	+	+
026/84	O26:[H11]	O	+	+	+	+
026/85	O26:[H11]	O	+	+	+	+
026/86	O26:H11	O	+	+	+	+
026/87	O26:[H11]	O	+	+	+	+
026/88	O26:H11	O	+	+	+	+
026/89	O26:[H11]	B	+	+	+	+
026/90	O26:[H11]	B	+	+	+	+
026/91	O26:[H11]	B	+	+	+	+
026/92	O26:[H11]	B	+	+	+	+
026/93a	O26:[H11]	B	+	+	+	+
026/96	O26:H11	L	+	+	+	+
026/97	O26:[H11]	L	+	+	+	+
026/98	O26:[H11]	L	+	+	+	+
026/99	O26:[H11]	B	+	+	+	+
026/100	O26:[H11]	B*	+	+	+	+
026/101	O26:HNM	B	+	+	+	+
026/123a	O26:[H11]	O	-	-	+	+
026/125a	O26:H11	B*	+	+	+	+
026/126	O26:[H11]	B*	+	+	+	-
026/128a	O26:[H11]	B*	+	+	-	+
026/129a	O26:[H11]	B*	+	+	+	+
026/130	O26:[H11]	O*	+	+	+	+
026/131	O26:H11	H	+	+	+	+
026/132	O26:H11	H	+	+	+	+
026/145	O26:H11	H	+	+	+	+
026/146	O26:H11	H	+	+	+	+
026/147	O26:H11	H	+	+	+	+
026/148	O26:H11	H	+	+	+	-
026/149	O26:H11	H	+	+	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d <i>terB</i> / <i>terD</i>	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
O26/150	O26:H11	CV	+	+	+	+
O26/151	O26:H11	CV	+	+	+	+
O26/152	O26:H11	CV	+	+	+	-
O26/153	O26:H11	CV	+	+	+	+
O26/155	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/156	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/159	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/160	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/161	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/163	O26:[H11]	O*	+	+	+	+
O26/164	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/165	O26:H11	H	-	+	+	+
O26/166	O26:[H11]	H	+	+	+	+
O26/167	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/168	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/169	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/171	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/172	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/174	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/175	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/176	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/177	O26:[H11]	H	+	+	+	+
O26/178	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/180	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/182	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/183	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/184	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/185	O26:H11	H	+	+	+	+
O26/186	O26:H11	H	+	+	+	+
C-13a	O26:H11	S (corzo)	+	+	+	+
C-18a	O26:H11	S (corzo)	+	+	+	+
C-145a	O26:H11	S (corzo)	+	+	+	+
C-115a	O26:H11	S (corzo)	+	+	+	+
XA-70e	O26:H11	S (jabalí)	+	+	+	+
IH13541/08A	O75:[H8]	H	+	+	-	+
C-47a	O75:[H8]	S (corzo)	+	+	+	+
XA-33a	O75:[H8]	S (jabalí)	+	+	-	+
IH59134/04A	O76:H19	H	-	-	+	+
IH59163/04A	O76:H19	H	-	-	+	+
VTH-80	O76:H19	H	-	-	+	+
VTO-67-26	O76:H19	O	-	-	+	+
VTO-141-45	O76:H19	O	-	-	+	+
VTO-396-147	O76:H19	O	-	-	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
VTO-315-119	O76:H19	O	-	+	+	+
VTO-311-117	O76:H19	O	-	-	+	+
VTO-300-112	O76:H19	O	-	-	+	+
VTO238-84	O76:H19	O	-	-	+	+
FV5185	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5189	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5200	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5202	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5211	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5240	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5242	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5250	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5257	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5260	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5264	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5269	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5272	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5277	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5288	O76:H19	C	-	+	+	+
FV5289	O76:H19	C	-	-	+	+
FV5297	O76:H19	C	-	-	+	+
IH30135/06D	O76:H19	H	-	-	+	+
IH42935/07A	O76:H19	H	-	-	+	+
XA-22b	O76:H19	S (jabali)	-	-	+	+
VTH-67	O77:H41	H	-	-	+	+
VTH-95A2	O77:H41	H	-	-	+	+
VTF-31B	O77:H41	CV	-	-	+	+
VTF-42	O77:H41	CV	-	-	+	+
VTB-40	O77:H41	B	-	-	+	+
VTB-215	O77:H41	B	-	-	+	+
VTB-241	O77:H41	B	-	-	+	+
VTB-237	O77:H41	B	-	+	+	+
VTB-67	O77:H41	B	+	+	+	+
VTB-121	O77:H41	B	-	-	+	+
VTB-155	O77:H41	B	+	+	+	+
VTB-269	O77:H41	B	+	+	+	+
IH40824A	O91:HNM	H	-	-	+	+
IH44249/04A	O91:HNM	H	-	-	+	+
VTH-35	O91:HNM	H	-	-	+	+
VTH-26	O91:HNM	H	-	-	+	+
VTH-13	O91:[H21]	H	-	-	+	+
CP24-5A-03	O91:HNM	CV	-	-	+	+
VTB-274	O91:[H21]	B	-	+	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d <i>terB</i> / <i>terD</i>	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
VTB-131	O91:[H21]	B	-	-	+	+
VTB-18	O91:[H21]	B	-	-	+	+
VTB-81	O91:[H21]	B	-	-	+	+
VTB-157	O91:[H21]	B	-	-	+	+
VTB-201	O91:[H21]	B	-	-	+	+
VTO-28	O91:[H14]	O	-	-	+	+
VTO-77	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-164	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-180	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-221	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-355	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-364	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-298	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-475	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-434	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-235	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-448-156	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-490-1-180	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-91	O91:[H14]	O	-	-	+	+
FV1730	O91:HNM	O	-	+	+	+
FV1738	O91:HNM	O	-	-	+	+
FV1740	O91:HNM	O	-	-	+	+
FV1762	O91:HNM	O	-	-	+	+
FV1768	O91:HNM	O	-	-	+	+
FV1769	O91:HNM	O	-	-	+	+
VTO-491-182	O91:HNM	O	-	-	+	+
IH53316/04a	O98:[H21]	H	-	-	+	-
Z-108a	O98:[H21]	S (zorro)	+	-	+	-
IH10496/04A	O103:[H2]	H	+	+	+	+
IH40139/05A	O103:[H2]	H	+	+	+	+
IH49694/05A	O103:[H2]	H	-	-	+	+
VTH-74	O103:[H2]	H	+	+	+	+
27-6A	O103:[H2]	CV	+	+	+	+
VTF-6	O103:[H2]	CV	+	+	+	+
VTB-376	O103:[H2]	B	+	+	+	+
B40	O103:[H2]	B*	+	+	+	+
B31	O103:[H2]	B*	+	+	+	+
VTB-103	O103:[H2]	B	+	+	+	+
VTB-286	O103:[H2]	B	+	+	+	+
VTO-173	O104:H7	O	+	+	+	+
VTO-183	O104:H7	O	+	+	+	+
VTO-16	O104:H7	O	+	+	-	+
VTO-17	O104:H7	O	+	+	-	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
VTO-19	O104:H7	O	+	+	-	+
VTO-318	O104:H7	O	+	+	+	+
VTO-346	O104:H7	O	+	+	+	+
VTO-63	O104:H7	O	+	+	-	+
FV3332	O104:H7	O	+	+	+	+
VTO-392-145	O104:H7	O	+	+	+	+
B45	O104:H21	B*	+	+	+	+
VTB-288	O104:H21	B	+	+	+	+
IH31696B	O111:[H8]	H	+	+	+	+
IH43697J	O111:[H8]	H	+	+	+	+
IH49791/05A	O111:[H8]	H	+	+	+	+
IH24497/06A	O111:[H8]	H	+	+	+	+
IH32243/06A	O111:[H8]	H	+	+	+	+
IH4215/07A	O111:[H8]	H	+	+	+	+
IH39241/07A	O111:[H8]	H	+	+	+	+
CP1-01	O111:[H8]	CV	+	+	+	+
CP11-01	O111:[H8]	CV	+	+	+	+
B41	O111:[H8]	B*	+	+	+	-
VTB-351	O111:[H8]	B	+	+	+	+
IH21228B	O113:H21	H	+	+	+	+
IH21485A	O113:H21	H	-	-	+	+
IH39595/07C	O113:H21	H	+	+	+	+
VTH-56A1	O113:H21	H	-	-	+	+
VTH-47	O113:H21	H	+	+	+	+
VTF-14A	O113:H21	CV	-	-	+	+
VTF-25	O113:H21	CV	+	+	+	+
VTB-104	O113:H21	B	+	+	+	+
VTB-117	O113:H21	B	+	+	+	+
VTB-200	O113:H21	B	+	+	+	+
VTB-346	O113:H21	B	+	+	+	+
VTB-412	O113:H21	B	+	+	+	+
IH9913/07A	O113:H21	H	+	+	+	+
VTO-60	O117:HNM	O	+	+	+	+
VTO-200	O117:HNM	O	+	+	+	+
VTO-132	O117:HNM	O	+	+	+	+
VTO-409	O117:HNM	O	+	+	+	+
VTO-688-244	O117:HNM	O	+	+	+	+
VTO-668-232	O117:HNM	O	+	+	+	+
VTO-678-234	O117:HNM	O	+	+	+	+
VTO692-248	O117:HNM	O	+	+	+	+
VTO-328-123	O117:HNM	O	+	+	+	-
IH16720/04A	O118:H16	H	+	+	+	+
IH31928/04A	O118:H16	H	+	+	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
IH43459/05A	O118:H16	H	+	+	+	+
VTH-62	O118:H16	H	+	+	+	+
VTH-28	O118:H16	H	+	+	+	+
VTF-26	O118:H16	CV	+	+	+	+
VTB-247	O118:HNM	B	+	+	+	+
VTB-248	O118:HNM	B	+	+	+	+
VTB-110	O118:H16	B	+	+	+	+
VTB-113	O118:H16	B	+	+	+	+
IH2536/07A	O118:H16	H	+	+	+	+
IH2673/07A	O118:H16	H	+	+	+	+
IH4185/07A	O118:H16	H	+	+	+	+
IH56637/04a	O121:H19	H	+	+	+	+
C-167	O121:H19	S (corzo)	+	+	+	+
VTH-52	O128:H2	H	-	-	+	+
FV5208	O128:H2	C	-	-	+	+
FV5212	O128:[H2]	C	-	-	+	+
FV5215	O128:H2	C	-	-	+	+
FV1731	O128:[H2]	O	-	-	+	+
FV1742	O128:[H2]	O	-	-	+	+
FV1743	O128:[H2]	O	+	+	+	+
FV1744	O128:[H2]	O	-	-	-	+
FV1763	O128:[H2]	O	-	-	+	+
FV1811	O128:[H2]	C	-	-	+	+
FV1800	O128:H2	C	-	-	+	+
VTO-72	O128:[H2]	O	-	-	+	+
VTO-51	O128:[H2]	O	-	-	+	+
VTO-104	O128:[H2]	O	-	-	+	+
VTO-216	O128:[H2]	O	-	-	+	+
VTO-303	O128:[H2]	O	-	-	+	+
VTO-265	O128:[H2]	O	-	-	+	+
VTO-309	O128:[H2]	O	-	-	+	+
VTO-139	O128:[H2]	O	+	+	+	+
VTO-231	O128:[H2]	O	-	-	+	+
VTO-332	O128:[H2]	O	-	-	+	+
VTO-34	O128:H2	O	-	-	+	+
VTO-9	O128:H2	O	-	-	+	+
VTO-156	O128:H2	O	-	-	+	+
VTO-101	O128:H2	O	-	-	+	+
VTO-201	O128:H2	O	-	-	+	+
VTO-195	O128:H2	O	-	-	+	+
VTO-416	O128:H2	O	-	-	+	+
IH32814/06A	O128:H2	H	-	-	+	-
IH2001/07A	O128:[H2]	H	-	-	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
IH2338/07A	O128:H2	H	-	-	+	+
IH40478C	O145:[H28]	H	+	+	+	+
IH36956/05A	O145:[H28]	H	+	+	+	+
VTH-106	O145:[H28]	H	+	+	+	+
VTH-105A	O145:[H28]	H	+	+	+	+
CP144-6-21-03	O145:[H28]	CV	+	+	+	+
IH38354/05A	O145:[H28]	H	+	+	+	+
IH37847/06A	O145:[H28]	H	+	+	+	+
C-83a	O145:[H28]	S (corzo)	+	+	+	+
VTO-210	O146:[H21]	O	+	+	+	+
VTO-33-13	O146:[H21]	O	+	+	+	+
VTO-203-64	O146:[H21]	O	+	+	+	+
VTO-509-190	O146:[H21]	O	+	+	+	+
VTO-537-199	O146:[H21]	O	+*	+d	+	+
VTO-76	O146:H21	O	+	+	+	+
VTO-32	O146:H21	O	+	+	+	+
VTO-213	O146:H21	O	+	+	+	+
VTO-324	O146:H21	O	+	+	+	+
VTO-370	O146:H21	O	+	+	+	+
VTO-181-49	O146:H21	O	+	+	+	+
VTO-54-22	O146:H21	O	+*	+d	+	+
VTO-227-79	O146:H21	O	+	+	+	+
VTO-612-220	O146:H21	O	+	+	+	+
VTO-67	O146:H21	O	+*	+d	+	+
VTO-284	O146:H21	O	+	+	+	+
VTO-128	O146:H21	O	+	+	-	+
VTO-182-50	O146:H21	O	+	+	-	+
FV8065	O146:H21	O	+	+	+	+
FV8128	O146:[H21]	O	+	+	+	+
FV8147	O146:H21	O	+	+	+	+
FV8172	O146:H21	O	+	+	+	+
FV8223	O146:[H21]	O	+	+	-	+
FV8246	O146:[H21]	O	+	+	+	+
FV8376	O146:[H21]	O	+	+	+	+
FV8402	O146:H21	O	+	+	+	+
FV8411	O146:H21	O	+	+	+	+
FV8415	O146:H21	O	+	+	+	+
FV8595	O146:H21	O	+	+	+	+
VTF-13	O146:[H21]	CV	+	+	+	+
FV4256	O146:H21	L	+	+	+	+
FV4372	O146:H21	L	+	+	+	+
FV4328	O146:H21	L	+	+	+	+
FV4314	O146:H21	L	+	+	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
FV4304	O146:H21	L	+	+	+	+
VTB-105	O146:H21	B	+*	+d	+	+
IH1956/08A	O146:H21	H	+	+	+	+
FV5221	O146:H21	C	+	+	+	+
FV5222	O146:[H21]	C	+	+	+	+
FV5226	O146:[H21]	C	+	+	+	+
FV5194	O146:H21	C	+	+	+	+
FV5213	O146:H21	C	+	+	+	+
FV5229	O146:H21	C	+	+	+	+
FV5235	O146:H21	C	+	+	+	+
FV5256	O146:H21	C	+	+	+	+
FV8727	O146:H21	C	+*	+d	+	+
FV7875	O146:H21	C	+	+	+	+
FV7803	O146:H21	S (corzo)	+*	+d	-	+
FV7806	O146:H21	S (muflón)	+*	+d	+	+
FV7817	O146:H21	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7822	O146:H21	S (ciervo)	+*	-	+	+
FV7852	O146:H21	S (ciervo)	+*	+d	+	+
IH27893A	O146:H21	H	+	+	+	+
IH33439/04A	O146:[H21]	H	+	+	+	+
IH52332/04A	O146:H21	H	+	+	+	+
IH53493/04A	O146:H21	H	+	+	+	+
IH32712/05A	O146:H21	H	+	+	+	+
IH52224/05A	O146:H21	H	+	+	+	+
IH25340/06A	O146:H21	H	+	+	+	+
IH25515/07A	O146:H21	H	+	+	+	+
IH54779/05A	O146:H21	H	+	+	+	+
IH47534/07A	O146:H21	H	+	+	+	+
IH35806/07a	O146:[H21]	H	+	+	+	+
IH40390/07a	O146:[H21]	H	+	+	+	+
IH47900/07a	O146:[H21]	H	+	+	+	+
IH50580/07a	O146:[H21]	H	+	+	+	+
IH101706/07b	O146:[H21]	H	+	+	+	+
IH37598/08a	O146:[H21]	H	+	+	+	+
FV1720	O146:H21	O	+	+	+	+
FV1725	O146:H21	O	+	+	+	+
FV1812	O146:H21	C	+*	+d	+	+
FV8774	O146:H21	C	+*	+d	+	+
C-3a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-4a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-9a	O146:H21	S (corzo)	+	+	-	-
C-50a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-55a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
C-71a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-71c	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-77a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-81a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-85a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-99a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-100a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-106b	O146:H21	S (corzo)	-	+	+	+
C-121a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-134a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-135a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	-
C-138a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	-
C-141a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-142a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-149a	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
C-154b	O146:H21	S (corzo)	+	+	+	+
Xa-47a	O146:H21	S (jabalí)	+	+	+	+
Xa-54a	O146:H21	S (jabalí)	+	+	+	+
Xa-115a	O146:H21	S (jabalí)	+	+	+	+
Xa-235a	O146:H21	S (jabalí)	+	+	+	+
Z-215a	O146:H21	S (zorro)	+	+	+	+
VH-46-6a	O146:[H21]	PA (lechuga)	+	+	+	+
VH-46-6b	O146:[H21]	PA (lechuga)	+	+	+	+
FV7807	O146:[H28]	S (gamo)	+	+	+	+
FV7811	O146:[H28]	S (ciervo)	+*	+d	+	+
FV7825	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7835	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7838	O146:[H28]	S (ciervo)	+*	+d	+	+
FV7839	O146:[H28]	S (ciervo)	+*	+d	+	+
FV7840	O146:[H28]	S (ciervo)	+*	+d	+	+
FV7841	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7842	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7847	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7853	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7854	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7855	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7860	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7861	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7864	O146:[H28]	S (ciervo)	+	+	+	+
FV7868	O146:[H28]	S (ciervo)	+*	+d	+	+
C-32a	O146:H28	S (corzo)	-	+	+	+
IH1549/07A	O146:[H28]	H	+	+	+	+
VTB-386	O156:[H10]	B	-	-	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d <i>terB</i> / <i>terD</i>	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
VTB-397	O156:[H10]	B	-	-	+	+
VTB-315	O156:[H10]	B	-	-	+	+
VTB-314	O156:[H10]	B	-	-	+	+
VTB-312	O156:[H10]	B	-	-	+	+
IH32862A	O156:H25	H	+	+	+	+
IH38296A	O156:H25	H	+	+	+	+
VTH-56-A2	O156:[H25]	H	+	+	+	+
VTB-189	O156:H25	B	+	+	+	+
VTB-289	O156:[H25]	B	+	+	+	+
VTB-378	O156:[H25]	B	+	+	+	+
VTB-306	O156:[H25]	B	+	+	+	+
VTO-22	O156:H25	O	+	-	+	+
VTO-50	O156:[H25]	O	+	-	+	+
VTO-98	O156:[H25]	O	-	-	-	+
VTO-203	O156:[H25]	O	+	-	+	+
VTO-242	O156:H25	O	+	-	+	+
VTO-439	O156:[H25]	O	-	-	-	+
VTO-471	O156:H25	O	+	-	-	+
VTO-459	O156:H25	O	+	+	+	+
VTO-390	O156:[H25]	O	+	-	-	+
VTO-641-224	O156:H25	O	+	-	-	+
O157/24	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/30	O157:[H7]	B	-	-	-	-
O157/34	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/37	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/38	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/39	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/41	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/42	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/55	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/60	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/64	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/66	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/70	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/74	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/79	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/89	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/90	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/95	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/98	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/116	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/121	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/123	O157:[H7]	B	+	+	-	-

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
O157/127	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/129C	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/132M	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/142M	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/143M	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/149M	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/156	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/163	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/164	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/166	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/167	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/186	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/196	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/206	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/207	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/223	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/229	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/235	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/238	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/248	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/249	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/256	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/259	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/262	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/265	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/268	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/271	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/274	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/277	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/280	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/283	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/286	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/289	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/292	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/295	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/300	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/307	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/310	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/315	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/320	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/325	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/330	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/335	O157:[H7]	B	+	+	-	-

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
O157/340	O157:[H7]	B	-	-	-	-
O157/342	O157:[H7]	B	-	+d	-	-
O157/344	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/346	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/348	O157:[H7]	B	-	-	-	-
O157/350	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/352	O157:[H7]	B	+	+d	-	-
O157/354	O157:[H7]	B	-	-	-	-
O157/356	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/358	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/360	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/362	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/364	O157:[H7]	B	-	-	-	-
O157/366	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/371	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/376	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/377	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/378	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/379	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/380	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/382	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/383	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/388	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/390	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/400	O157:[H7]	B	+	+d	-	-
O157/401	O157:[H7]	B	-	-	-	-
O157/407	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/412	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/436	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/454	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/455	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/456	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/457	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/458	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/459	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/460	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/461	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/462	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/463	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/464	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/465	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/466	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/467	O157:[H7]	B	+	+	-	-

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
O157/468	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/469	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/471	O157:[H7]	B	-	-	-	-
O157/473	O157:[H7]	B	-	-	-	-
O157/474	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/475	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/476	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/479	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/484	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/487	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/492	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/494	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/499	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/500	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/501	O157:[H7]	B	+	+d	-	-
O157/515	O157:[H7]	H	+*	+d	-	-
O157/517	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/522	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/523	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/524	O157:[H7]	B	+	+d	-	-
O157/525	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/535	O157:[H7]	H	+	+d	-	-
O157/540	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/545	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/558	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/569	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/572	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/575	O157:[H7]	B	+	+	-	-
O157/585	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/590	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/593	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/594	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/599	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/600	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/601	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/602	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/603	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/604	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/605	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/606	O157:[H7]	L	+	+d	-	-
O157/607	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/608	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/609	O157:[H7]	H	+	+	-	-

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d <i>terB</i> / <i>terD</i>	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
O157/610	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/611	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/612	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/613	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/614	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/615	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/616	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/617	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/618	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/619	O157:[H7]	H	-	+d	-	-
O157/620	O157:[H7]	H	+	+d	-	-
O157/621	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/622	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/623	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/624	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/625	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/626	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/629	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/680	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/681	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/682	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/683	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/689	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/690	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/692	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/693	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/694	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/696	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/697	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/698	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/699	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/700	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/701	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/702	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/704	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/705	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/706	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/707	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/708	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/709	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/710	O157:[H7]	L	+	+	-	-
O157/711	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/712	O157:[H7]	CV	+	+	-	-

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
O157/713	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/714	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/716	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/718	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/720	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/722	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/724	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/725	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/726	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/728	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/729	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/730	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/731	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/732	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/737	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/739	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/741	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/743	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/749	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/751	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/790	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/791	O157:[H7]	H	-	+d	-	-
O157/792	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/793	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/795	O157:[H7]	H	+	+d	-	-
O157/800	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/805	O157:[H7]	LC	+	+	-	-
O157/807	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/809	O157:[H7]	H	+*	+d	-	-
O157/810	O157:[H7]	H	-	+d	-	-
O157/811	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/812	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/814	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/815	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/816	O157:[H7]	CV	+	+	-	-
O157/818	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/820	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/822	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/827	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/832	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/837	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/842	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/843	O157:[H7]	H	+	+	-	-

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d <i>terB</i> / <i>terD</i>	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
O157/844	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/847	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/849	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/851	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/853	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/855	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/857	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/859	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/861	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/863	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/865	O157:[H7]	S (ciervo)	+	+	-	-
O157/867	O157:[H7]	S (ciervo)	+*	-	-	-
O157/871	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/875	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/877	O157:[H7]	O	+	+	-	-
O157/881	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/886	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/891	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/896	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/906	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/911	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/921	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/926	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/927	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/931	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/932	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/936	O157:[H7]	C	+	+	-	-
O157/937	O157:[H7]	C	+	+	-	-
O157/938	O157:[H7]	C	+	+	-	-
O157/939	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/944	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/945	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/954	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/973	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/974	O157:[H7]	H	-	-	-	-
O157/978	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/988	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/989	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1075	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1076	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1081	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1086	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1091	O157:[H7]	H	+	+	-	-

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d terB / terD	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
O157/1096	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1103	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1108	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1113	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1118	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1123	O157:[H7]	H	+	+	-	-
O157/1124	O157:[H7]	H	+	+	-	-
C-104	O157:[H7]	S (corzo)	+	+	-	-
XA-108	O157:[H7]	S (jabalí)	+	+	-	-
IH27988/04A	O166:H28	H	+	+	+	+
VTH-83F	O166:H28	H	-	-	+	+
VTH-122	O166:H28	H	-	-	+	+
FV4300	O166:H28	L	+	+	+	+
FV4281	O166:H28	L	+	+	+	+
FV4371	O166:H28	L	+	+	+	+
FV4236	O166:H28	L	+	+	+	+
FV4329	O166:H28	L	+	+	+	+
FV4318	O166:H28	L	+	+	+	+
FV4282	O166:H28	L	+	+	+	+
FV4323	O166:H28	L	+	+	+	+
CP86-6F-03	O166:H28	CV	+	+	+	+
VTB-273	O166:H28	B	-	-	+	+
FV5196	O166:H28	C	-	-	+	+
FV5265	O166:H28	C	-	-	+	+
FV1747	O166:H28	O	-	-	+	+
FV1753	O166:H28	O	-	-	+	+
FV1760	O166:H28	O	-	-	+	+
FV1764	O166:H28	O	-	-	+	+
FV1782	O166:H28	C*	-	-	+	+
FV1786	O166:H28	C	-	-	+	+
FV1787	O166:H28	C	-	-	+	+
FV1795	O166:H28	C	-	-	+	+
FV1802	O166:H28	C	-	-	+	+
FV1806	O166:H28	C	-	-	+	+
FV1813	O166:H28	C	+	+	+	+
FV1816	O166:H28	C	-	-	+	+
FV1817	O166:H28	C	+	+	+	+
VTO-265-101	O166:H28	O	+	+	+	+
VTO-287-106	O166:H28	O	+	+	+	+
VTO-340-128	O166:H28	O	+	+	+	+
VTO-455-159	O166:H28	O	+	+	+	+
VTO-363-136	O166:H28	O	-	-	+	+
VTO-423-153	O166:H28	O	+	+	+	+

Código cepa	Serotipo	^a Origen	^d <i>terB</i> / <i>terD</i>	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	^c β-glucuronidasa
VTO-350-130	O166:H28	O	+	+	+	+
VTO-41-19	O166:H28	O	-	-	+	+
VTO-95-41	O166:H28	O	+	+	+	+
VTO-38-17	O166:H28	O	-	-	+	+
VTO-472-170	O166:H28	O	-	-	+	+
VTO-599-215	O166:H28	O	-	-	+	+
VTO-568-209	O166:H28	O	-	-	+	+
VTO-155	O166:H28	O	-	-	+	+
VTO-85	O166:H28	O	-	-	+	+

^aOrigen de aislamiento de las cepas (B: heces de ganado bovino; B*: heces de ganado bovino con diarrea; C: heces de ganado caprino; C*: heces de ganado caprino con diarrea; LC: leche de caprino; CV: carne de vacuno; H: heces de humano con diarrea; L: leche de ovino; O: heces de ganado ovino; O*: heces de ganado ovino con diarrea; PA: producto agrícola; S: heces de animal silvestre). ^bFermentación del sorbitol en el medio MACS. ^cDetección de la producción de la β-glucuronidasa en el medio Chromocult® (Merck). ^d*terB*/*terD* (+*: determinado mediante secuenciación del gen *terD*). ^eCrecimiento en el medio MACSTC (+d: crecimiento débil)

4.2. ASIGNACIÓN DE SEROPATOTIPOS

Una vez completado el serotipo de las 820 cepas, confirmando los antígenos O y H de aquellas cepas dudosas mediante serotipado y/o PCR, se asignó a continuación el seropatotipo (Tabla 28) en base a la clasificación establecida por Karmali *et al.* (2003), a los datos de estudios previos (Girardeau *et al.* 2005; Hussein, 2007; Coombes *et al.* 2008), y a la información obtenida de la propia colección de ECVT del LREC sobre la asociación de los serotipos de aislados clínicos humanos con gravedad del cuadro clínico. Estas asignaciones se analizan de forma detallada en los apartados de los grupos clonales correspondientes (Apartado 4.5.).

Tabla 28. Asignación de seropatotipo a las cepas del estudio

Serotipos	Seropatotipo	Nº cepas
O5:HNM	C	15
O8:H2	C	7
O20:H19	D	10
O26:[H11]/HNM	B	125
O75:[H8]	D	3
O76:H19	D	30
O77:H41	D	12
O91:[H14]/HNM/[H21]	C	33
O98:[H21]	D	2
O103:[H2]	B	11
O104:H7/H21	C (H21) / D (H7)	C (2) / D (10)
O111:[H8]	B	11
O113:H21	C	13
O117:HNM	D	9
O118:H16/HNM	C	13
O121:H19	B	2
O128:[H2]	C	31
O145:[H28]	B	8
O146:[H21]/[H28]	C (H28) / D (H21)	C (19) / D (100)
O156:[H10]/[H25]	C (H25) / D (H10)	C (17) / D (5)
O157:[H7]	A	289
O166:H28	D	43

4.3. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS

Estudios previos indican que las cepas ECVT se engloban, fundamentalmente, en el grupo filogenético B1, y muy pocas cepas pertenecen al grupo B2. Los grupos filogenéticos A y D representan, aproximadamente, el 20 y 10%, respectivamente (Donnenberg y Whittam, 2001; Escobar-Páramo *et al.* 2004a; Girardeau *et al.* 2005). En el presente estudio determinamos el filogrupo de 820 cepas ECVT, empleando el esquema ampliado (Clermont *et al.* 2013) que discrimina los 7 filogrupos principales de *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E, F).

En concordancia con lo indicado en otros estudios, el filogrupo B1 apareció asociado a la mayoría de los serotipos incluidos en este estudio (en 24 de las 29 combinaciones O:H de la Tabla 29). El segundo filogrupo más prevalente en nuestras cepas fue el filogrupo E (previamente clasificado como D según el esquema abreviado de Clermont *et al.* 2000), en 4

de las 29 combinaciones O:H, y representado principalmente por las cepas del serotipo O157:[H7]. El filogrupo F solo lo encontramos asociado a las cepas O146:[H28], y el filogrupo A a un subgrupo de cepas O5:HNM (Tabla 29).

Tabla 29. Asociación de serotipos y filogrupos

Serotipos	Filogrupo
O5:HNM	A / B1
O8:H2	B1
O20:H19	B1
O26:[H11]/HNM	B1
O75:[H8]	B1
O76:H19	B1
O77:H41	E
O91:[H14]/HNM/[H21]	B1
O98:[H21]	B1
O103:[H2]	B1
O104:H7/H21	B1
O111:[H8]	B1
O113:H21	B1
O117:HNM	B1
O118:H16/HNM	B1
O121:H19	B1
O128:[H2]	B1
O145:[H28]	E
O146:[H21]	B1
O146:[H28]	F
O156:[H10]/[H25]	B1
O157:[H7]	E
O166:H28	E

4.4. SECUENCIAS TIPO (ST)

Siguiendo el esquema MLST de Achtman, se obtuvieron a través de la página web *E. coli* MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) los perfiles alélicos de los 7 genes (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, y *recA*), las secuencias tipo (ST), y los complejos ST (ST Cplx).

La determinación de ST se realizó en un número representativo de cepas de cada serotipo, atendiendo a los resultados de filogrupos, genes de virulencia y perfiles de macrorrestricción. En la Tabla 30 se detalla la asociación entre los 29 serotipos de las 820 cepas del presente estudio, el perfil alélico de los 7 genes incluidos en el esquema MLST de Achtman y las 41 ST asignadas. Tres de esas 41 ST se asociaron a más de un serotipo: ST21 (O26:[H11]/HNM y O118:H16); ST442 (O146:[H21] y O91:[H21]); ST1817 (O104:H7 y O117:HNM). Este hecho ya ha sido descrito para otras ST como ST10, ST57, ST95, ST117, ST131, ST300 (Mora *et al.* 2012b, 2013; Dahbi *et al.* 2014; Iguchi *et al.* 2015a).

Tabla 30. Asociación de serotipos y combinaciones alélicas, ST y ST Cplx según el esquema de Achtman

Serotipo	<i>adK-fumC-gyrB-icd-mdh-purA-recA</i>	ST ^a	ST Cplx ^a
O5:HNM	1-46-69-1-20-34-7	342	None
	6-4-5-16-9-8-7	447	None
	10-11-4-8-8-8-171	1797*	None
O8:H2	6-4-3-18-9-7-7	1798*	None
	6-4-3-18-203-7-7	1834*	None
O20:H19	63-30-15-18-43-8-7	192	None
	6-23-15-16-9-8-7	205	205
	6-19-15-16-9-8-7	443	205
O26:[H11]/HNM	16-4-12-16-9-7-7	21	29
	6-4-12-16-9-7-7	29	29
O75:[H8]	6-6-5-9-9-8-2	13	13
O76:H19	6-23-32-16-9-8-7	675	None
O77:H41	35-3-58-6-5-16-4	720	None
O91:[H14]/HNM	6-4-4-1-22-8-7	33	None
O91: [H21]	6-95-33-18-9-8-14	442	None
O98:[H21]	77-7-7-18-54-18-7	306	None
O103:[H2]	6-4-3-17-7-7-6	17	20
	91-4-3-17-7-7-6	386	20
	6-4-3-17-7-204-6	1967*	None
O104:H7	9-8-5-231-11-194-7	1817*	None
	9-351-5-231-11-194-7	2283*	None
O104:H21	6-4-126-136-11-8-6	672	None
O111:[H8]	6-4-12-16-9-7-12	16	29
O113:H21	6-4-4-18-24-5-14	56	155
	6-4-4-18-24-8-14	223	155
	6-278-4-18-24-5-14	1821*	None
O117:HNM	9-8-5-231-11-194-148	1816*	None
	9-8-5-231-11-194-7	1817*	None
O118:H16/HNM	16-4-12-16-9-7-7	21	29
O121:H19	100-23-68-45-1-35-7	655	None
O128:[H2]	6-6-14-21-9-7-7	25	None
O145:[H28]	19-23-18-24-21-2-16	32	32
O146:[H21]	6-95-33-18-9-8-14	442	None
O146:[H28]	130-45-41-22-7-50-45	738	None
O156:[H10]	6-4-15-103-24-8-7	441	None
O156:[H25]	77-7-72-18-53-56-7	300	None
O157:[H7]	12-12-8-12-15-2-2	11	11
	12-12-8-140-15-2-2	1799*	None
	12-12-8-12-15-8-2	1804*	None
	12-287-8-12-15-2-2	1825*	None
	12-12-8-12-202-2-2	1826*	None
	12-285-8-12-15-2-2	1833*	None
O166:H28	87-90-231-10-1-187-138	1819*	None
	87-90-231-10-1-196-138	1824*	None

*ST asignadas por primera vez a las cepas de este estudio.

^aSombreadas con el mismo color las ST que comparten 6 de los 7 loci, por lo que pertenecerían, en su caso, al mismo ST Cplx (grupos de al menos 3 ST que comparten 6 alelos en las comparaciones por pares)

4.5. DEFINICIÓN DE GRUPOS CLONALES

En el presente estudio se utilizó el concepto de grupo clonal, definido por primera vez por nosotros (Mora *et al.* 2010), y reconocido posteriormente por otros investigadores (Manges, 2016).

Según nuestra definición, un grupo clonal incluiría cepas del mismo serotipo, filogrupo y ST (o secuencias tipo que por su similitud alélica quedasen agrupadas dentro del mismo ST Cplx). De acuerdo con esta definición, se identificaron 29 grupos clonales entre las 820 cepas del presente estudio. En la Tabla 31 se correlacionan dichos grupos con el perfil de virulencia más representativo en base a los genes caracterizados en este estudio.

Tabla 31. Grupos clonales definidos en el presente estudio en base al serotipo, grupo filogenético y ST: tipos y subtipos *vt* y *eae* predominantes asociados a dichos grupos clonales

Grupo clonal	^a <i>vt1</i>	^a <i>vt2</i>	^b <i>eae</i>	^c Otros genes de virulencia
O5:HNM-A-ST342 O5:HNM-B1-ST447 O5:HNM-A-ST1797	<i>vt1a</i> <i>vt1c</i> <i>vt1c</i>	<i>vt2a</i> <i>vt2b</i> <i>vt2b</i>	<i>eae</i> -B1 - -	<i>E-hlyA</i> , <i>espP</i> <i>E-hlyA</i> <i>subAB</i> *
O8:H2-B1-ST1798/ST1834	<i>vt1a</i>	<i>vt2d</i>	-	<i>E-hlyA</i> , <i>espP</i> , <i>subAB</i> , <i>saa</i>
O20:H19-B1-ST192 O20:H19-B1-ST205/ST443	- <i>vt1a</i>	<i>vt2c</i> , <i>vt2d</i> <i>vt2a</i>	- -	<i>E-hlyA</i> , <i>saa</i> , <i>espP</i>
O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29	<i>vt1a</i>		<i>eae</i> -B1	
O75:[H8]-B1-ST13	<i>vt1c</i>	<i>vt2b</i>	-	<i>E-hlyA</i> , <i>subAB</i> *
O76:H19-B1-ST675	<i>vt1c</i>	-	-	<i>E-hlyA</i> , <i>subAB</i> *
O77:H41-E-ST720	<i>vt1a</i>	<i>vt2d</i>	-	
O91:[H14]/HNM-B1-ST33 O91:[H21]-B1-ST442	<i>vt1a</i> <i>vt1a</i>	<i>vt2b</i> <i>vt2a</i>	- -	<i>subAB</i> *, <i>iutA</i> <i>E-hlyA</i>
O98:[H21]-B1-ST306	<i>vt1a</i>	-	<i>eae</i> -ζ1	<i>E-hlyA</i> , <i>espP</i>
O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967	<i>vt1a</i>	-	<i>eae</i> -ε1	
O104:H7-B1-ST1817/ST2283 O104:H21-B1-ST672	<i>vt1c</i> -	- <i>vt2a</i>	- -	
O111:[H8]-B1-ST16	<i>vt1a</i>	<i>vt2a</i>	<i>eae</i> -θ	
O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821	-	<i>vt2a</i> , <i>vt2d</i>	-	<i>espP</i>
O117:HNM-B1/ST1816/ST1817	<i>vt1c</i>	-	-	
O118:H16/HNM-B1-ST21	<i>vt1a</i>	-	<i>eae</i> -B1	<i>iutA</i>
O121:H19-B1-ST655	-	<i>vt2a</i>	<i>eae</i> -ε1	
O128:[H2]-B1-ST25	<i>vt1c</i>	<i>vt2b</i>	-	<i>subAB</i> *
O145:[H28]-E-ST32	<i>vt1a</i>	<i>vt2a</i>	<i>eae</i> -γ1	
O146:[H21]-B1-ST442 O146:[H28]-F-ST738	<i>vt1c</i> -	<i>vt2b</i> <i>vt2b</i>	- -	<i>E-hlyA</i> , <i>subAB</i> * <i>E-hlyA</i>
O156:[H10]-B1-ST441 O156:[H25]-B1-ST300	- <i>vt1a</i> , <i>vt1c</i>	<i>vt2a</i> -	- <i>eae</i> -ζ	<i>espP</i> <i>E-hlyA</i> , <i>stcE</i>
O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ST1804/ST1825/ST1826/ST1833	<i>vt1a</i>	<i>vt2a</i> , <i>vt2c</i>	<i>eae</i> -γ1	<i>E-hlyA</i> , <i>katP</i> , <i>stcE</i>
O166:H28-E-ST1819/ST1824	<i>vt1c</i>	<i>vt2b</i>	-	<i>E-hlyA</i> , <i>subAB</i> *

^aSe muestran los subtipos *vt1* y *vt2* más representativos para cada grupo clonal; figura como - para aquellos grupos clonales en los que no se identificó ninguna cepa positiva para el tipo *vt* correspondiente. ^bFigura como - la ausencia del gen *eae* en todas las cepas analizadas del correspondiente grupo clonal. ^cSe muestra la presencia de otros genes de virulencia típicamente asociados al correspondiente grupo clonal (presentes en >85% las cepas) entre los analizados: *E-hlyA*, *subAB* (localización plasmídica o cromosómica*), *stcE*, *saa*, *katP*, *espP*, *iutA*.

4.5.1. Grupo clonal O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ST1804/ST1825/ST1826/ST1833

En el presente estudio se incluyeron 289 cepas de ECVT del serotipo O157:[H7], 143 de origen clínico humano, 78 aisladas de heces de ganado bovino, 22 de heces de ganado ovino, 3 de heces de ganado caprino, 16 de carne de vacuno, 22 de leche de oveja, 1 de leche de cabra y 4 aisladas de heces de animales silvestres. Esta colección procedía de diferentes puntos de la geografía española, obtenida entre los años 1980 y 2009 (Tabla 19). Hay que indicar que todas las cepas O157:[H7] incluidas en este estudio eran originariamente positivas para los genes *vt*, detectados mediante PCR. Algunas de ellas perdieron los fagos durante su conservación antes de poder ser tipadas/subtipadas.

Dentro de este serotipo se definió un único grupo clonal (O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ST1804/ST1825/ST1826/ST1833) en base a su filogrupo y ST, puesto que las 6 ST determinadas se agruparon dentro del mismo ST11 Cplx. Las ST1799, ST1804, ST1825, ST1826 y ST1833, descritas por primera vez en este estudio, son SLV de la ST11 (ver también discusión en el apartado 4.6.2.1.). La ST11 identificada mayoritariamente en nuestra colección (60 de 75 analizadas, 80 %) es la principal secuencia tipo asignada a las cepas de ECVT O157 a nivel mundial, independientemente del origen de aislamiento (Mellmann *et al.* 2008a; Underwood *et al.* 2013; Barth *et al.* 2016; Fierz *et al.* 2017; Zweifel *et al.* 2017).

El análisis de los genes asociados a la virulencia mostró que las 289 cepas eran portadoras del gen *eae* (subtipo *eae-γ1*); prácticamente todas las cepas eran *vt2* (salvo 22 cepas que perdieron los fagos antes de identificar si eran *vt1* y/o *vt2*); del orden de 118 cepas eran *vt1*, de las que únicamente 5 serían originariamente *vt2* negativas. Asimismo, la mayoría de las cepas eran portadoras de los genes *E-hlyA* (283, 99%), *katP* (271, 93,8%), *espP* (227, 78,5%) y *stcE* (aunque solo se investigó este gen a una selección, 126 de las 138 analizadas, 91,3%, fueron positivas). Ninguna cepa resultó positiva para los genes *saa*, *iucD*, *subAB*, y solo 3 de 72 cepas representativas que se analizaron adicionalmente para *iutA*. El subtipado de los genes *vt* realizado a cepas representativas de cada clúster, determinó que eran *vt1a* (las 34 cepas analizadas), y que las 45 cepas representativas para *vt2* eran *vt2a* y/o *vt2c* (11 cepas *vt2a*; 14 *vt2c*; 19 *vt2a vt2c*; 1 cepa *vt2c vt2d*).

Como era de esperar, todas las cepas ECVT del serotipo O157:[H7] de nuestra colección eran no fermentadoras de sorbitol y negativas para la β -glucuronidasa. Solo 25 de las 289 cepas no fueron capaces de mostrar ningún crecimiento en MACSTC y, adicionalmente, otras 14 cepas mostraron un crecimiento débil. Entre las 39 cepas con poco o ningún crecimiento en MACSTC, 28 resultaron negativas para los genes de *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27). La resistencia al telurito es una característica común al ECVT O157 aunque no es inherente a este grupo (Bielaszewska *et al.* 2011b). Al igual que nosotros, otros autores también aislaron cepas de ECVT O157 sensibles al telurito en América del Norte (Taylor *et al.* 2002) y Europa (Bielaszewska *et al.* 2005). Los datos obtenidos en un estudio realizado por

Bielaszewska *et al.* (2011b) sugerían que la supresión total o parcial de los genes de resistencia al telurito disminuía la virulencia de este patógeno.

El dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 289 cepas de ECVT O157 mostró una similitud de tan solo el 57,8% entre toda la colección; sin embargo, se determinaron 42 clústeres de similitud $\geq 85\%$, 20 de los cuales agrupaban cepas de origen clínico humano y de origen animal (clústeres I, III, V, VI, IX, X, XI, XII, XIV, XVI, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVIII, XXXIV, XXXV, XXXVIII y XXXIX) (Tabla 32 y Figura 19).

Otros autores han reportado también esta variabilidad en los perfiles de macrorrestricción de las cepas ECVT O157 (Ogura *et al.* 2006; Feng *et al.* 2007; Rump *et al.* 2015). De hecho, Gerner-Smidt *et al.* (2006) identificaron más de 25.000 perfiles de PFGE para ECVT O157, incluidos en la base de datos de PulseNet. A pesar de la heterogeneidad de nuestra colección, 5 de los 42 clústeres con similitud $\geq 85\%$ incluían más de 13 cepas cada uno, es decir, el 47% de las cepas (135/289) se agruparon en alguno de estos 5 clústeres, englobando todos ellos cepas de origen humano y de otros orígenes: clúster XXI (63 cepas), clúster XXIV (23 cepas), clúster V (21 cepas), clúster XIV (15 cepas) y clúster XXV (13 cepas) (Tabla 32). Es importante destacar que en el clúster XXI se obtuvieron perfiles de PFGE indistinguibles (100% identidad) de cepas aisladas de casos clínicos humanos y de origen bovino, incluso de distintos años de aislamiento. En este mismo clúster, también detectamos perfiles con 100% identidad entre cepas aisladas de heces de ganado bovino en distintas zonas geográficas (Lugo y A Coruña), lo que indicaría que estas cepas estarían presentes en nuestra Comunidad Autónoma, con un posible ciclo de mantenimiento y circulación: humanos-ganado bovino. El ganado ovino y los animales silvestres también se confirmarían como reservorios potenciales de cepas ECVT O157 para el ser humano, ya que demostramos que sus perfiles de macrorrestricción presentaban una similitud $>85\%$ con cepas aisladas de patología humana (clústeres I, III, V, IX, X, XI, XIV, XVI, XXI y XXV) (Tabla 32 y Figura 19).

Tabla 32. Clústeres determinados mediante PFGE de las cepas de ECVT O157

Clúster	Nº Cepas	Origen Cepas ^a	Año aislamiento
I	6	HD (1)	1998
		PA (1)	1998
		O (4)	2006
II	3	O (3)	2001
III	2	HD (1)	1999
		LO (1)	2001
IV	3	HD (3)	2004, 2007
V	21	HD (12)	1996, 1997, 2003, 2006, 2007
		LO (3)	2001
		B (3)	1998
		CV (3)	2003
VI	4	HD (1)	2000
		LO (1)	2001
		CV (2)	1999, 2002
VII	2	B (1)	1999
		LO (1)	2001
VIII	2	B (2)	1991, 1995
IX	3	HD (1)	2003
		LO (1)	2001
		O (1)	1997
X	3	LO (2)	2001
		HD (1)	1999
XI	2	LO (1)	2001
		HD (1)	2006
XII	3	HD (1)	2007
		B (1)	1998
		SUH (1)	2005
XIII	2	B (2)	1999
XIV	15	HD (4)	2003, 2006, 2008
		O (3)	1997, 2006
		LO (4)	2001
		B (3)	1998, 1999
		AS (1)	2009
XV	2	B (2)	1995, 1999
XVI	7	LO (1)	2001
		HD (4)	2003, 2006
		PA (1)	2003
		O (1)	2006
XVII	3	HD (3)	2001, 2004
XVIII	2	B (1)	1995

Clúster	Nº Cepas	Origen Cepas ^a	Año aislamiento
		O (1)	2006
XIX	2	HD (2)	1986, 1992
XX	3	C (3)	2006
XXI	63	HD (36)	1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008
		PA (2)	1995
		CH (2)	2004, 2007
		B (15)	1995, 1998, 1999
		CV (5)	1995, 1998, 1999, 2003, 2004,
		LO (3)	2001
XXII	2	B (1)	1994
		HD (1)	1995
XXIII	2	B (1)	1999
		CH (1)	2004
XXIV	23	B (14)	1995, 1998, 1999
		CV (2)	1997, 2002
		HD (4)	1996, 1997, 2000
		PA (1)	1997
		CH (1)	2006
		SUH (1)	2004
XXV	13	B (2)	1998, 1999
		HD (9)	1991, 1993, 1997, 1998, 2004, 2006
		CV (1)	1999
		AS (1)	2009
XXVI	2	HD (1)	1991
		SUH (1)	1999
XXVII	2	HD (1)	2004
		SUH (1)	1998
XXVIII	3	B (1)	1998
		HD (1)	2001
		CH (1)	2007
XXIX	4	SUH (1)	1997
		HD (3)	1999, 2005
XXX	2	LO (2)	2001
XXXI	2	HD (2)	2004, 2008
XXXII	2	HD (2)	1995, 1998
XXXIII	2	HD (2)	1996
XXXIV	2	PA (1)	1997
		B (1)	1995
XXXV	2	HD (1)	1996
		B (1)	1998

Clúster	Nº Cepas	Origen Cepas ^a	Año aislamiento
XXXVI	2	B (2)	1998, 1999
XXXVII	2	O (2)	2001
XXXVIII	2	B (1)	1999
		HD (1)	1999
XXXIX	4	HD (2)	1999, 2007
		B (2)	1999
XL	2	HD (2)	2004, 2006
XLI	7	B (7)	1998
XLII	2	B (2)	1998

^aOrigen de aislamiento de las cepas (B: heces de ganado bovino; CV: carne de vacuno; O: heces de ganado ovino; LO: leche de ovino; AS: heces de animal silvestre; HD: heces de humano con diarrea; CH: colitis hemorrágica; SUH: síndrome urémico hemolítico; PA: portador asintomático; C: heces de caprino). En rojo se resaltan los clústeres que incluyen cepas de origen clínico humano y de otros orígenes

Tal y como hemos confirmado en nuestra colección, las cepas O157 suelen ser portadoras de *vt2* (principalmente de los subtipos *vt2a* y *vt2c*) sola o en combinación con *vt1*, y hay numerosos estudios que analizan esta correlación. Ogura *et al.* (2015) realizaron un análisis detallado de 123 cepas O157 VT2 y de sus fagos. Sus datos indican que los fagos VT2c son altamente homogéneos. Sin embargo, la mayoría de los fagos VT2a se clasifican en 4 subtipos principales de acuerdo con sus proteínas de replicación, y estos subtipos se correlacionan con los niveles de producción de VT2a. En un estudio realizado por Bibbal *et al.* (2015) en Francia entre los años 2010 y 2011 en el que analizaron 1.318 muestras fecales de ganado bovino detectaron el ECVT O157 en 18 cepas, 14 de las cuales fueron VT2c, 3 VT2a y 1 VT2a VT2c. En otro estudio realizado por Bonardi *et al.* (2015) en Italia entre los años 2011 y 2012 se mostraba que el ECVT O157 aislado de ganado bovino puede albergar la verotoxina VT2c, variante asociada al SUH en humanos. González *et al.* (2016) también identificaron en Brasil cepas ECVT O157 aisladas de ganado vacuno sano portadoras del subtipo VT2c. Por otro lado, Kramarenko *et al.* (2016) aislaron cepas ECVT O157 de la piel de ganado vacuno recogidas en mataderos de Estonia y el subtipo de verotoxina más frecuentemente detectado fue el VT2c, solo o en combinación con el subtipo VT1a. Al igual que estos autores, entre las cepas aisladas de origen bovino de nuestra colección también observamos estos mismos subtipos de verotoxinas: VT2a, VT2c y VT2a VT2c, aunque nosotros también identificamos en cepas de origen bovino las variantes VT1a, VT1a VT2a y VT1a VT2c. En otro trabajo realizado por Tostes *et al.* (2017) en Canadá encontraron el ECVT O157 portador de los subtipos VT1a VT2a en ganado bovino. En cuanto a animales silvestres, Zweifel *et al.* (2017) identificaron las variedades VT1a y VT2a en cepas ECVT O157 aisladas de renos en un estudio realizado en Finlandia. Por otro lado, en un estudio realizado entre los años 2010 y 2014 en Suiza por Fierz *et al.* (2017) observaron las siguientes combinaciones de subtipos de

verotoxinas VT1a, VT2a, VT2c, VT1a VT2a, VT1a VT2c y VT2a VT2c entre las 18 cepas ECVT O157 de las 95 ECVT aisladas de pacientes.

Es importante destacar que en el presente estudio se realizó la técnica del fagotipado, incluida en muy pocos estudios a nivel mundial. El fagotipado de 277 de las 289 cepas ECVT O157 reveló un total de 29 fagotipos: 1, 2, 4, 8, 14, 20, 21, 21var, 23, 26, 27, 28, 31, 32, 32var, 34, 34var, 39, 42, 45, 50, 51, 54, 54v, 54var, 63, 63var, 83var y 87 (Tabla 33). No obstante, el 68,2% (189 cepas) se pudieron englobar en tan solo 6 fagotipos: 2 (45 cepas), 8 (66 cepas), 14 (18 cepas), 21 (11 cepas), 34 (13 cepas) y 54 (36 cepas). Los fagotipos 2 y 8 fueron los más frecuentemente determinados en las cepas de origen humano y de ganado bovino de nuestra colección, representando el 47,4% (64/135) y el 48,7% (38/78) de dichas cepas, respectivamente. Entre las 22 cepas aisladas de ganado ovino destacan los fagotipos 14 y 54, representando 59,1% (13/22).

Entre las cepas de ECVT O157 se han identificado al menos 90 fagotipos (Ahmed *et al.* 2001), pero sólo 7 (2, 4, 8, 14, 21/28, 32 y 54) son los que se describen como más frecuentes entre las cepas humanas aisladas en Canadá y Europa (Saari *et al.* 2001; Mora *et al.* 2004; Sánchez *et al.* 2010d). Los fagotipos 2 y 8 son predominantes entre las cepas humanas aisladas en España y en muchos otros países europeos, incluyendo a Bélgica, Finlandia, Alemania, Italia, Inglaterra y Escocia, mientras que el fagotipo 14 es mucho más frecuente en Canadá (Khakria *et al.* 1990; Heuvelink *et al.* 1995; Liesegang *et al.* 2000; Ahmed *et al.* 2001; Saari *et al.* 2001; Beutin *et al.* 2002a; Mora *et al.* 2004; Jenkins *et al.* 2015). El ECVT O157 del fagotipo 8 fue el causante de un brote entre diciembre de 2010 y julio de 2011 en Inglaterra, Escocia y Gales; en el cual se registraron 252 casos, 2 de SUH y un fallecido (Launders *et al.* 2016). Por otro lado, en un estudio realizado por Adams *et al.* (2016), en Inglaterra y Gales entre los años 1983 y 2012 observaron que el fagotipo 2 se redujo hasta el 3% de los casos en 2012, mientras que cepas de fagotipo 8 y el fagotipo 21/28 emergieron constituyendo casi 2 tercios de los casos para ese mismo año 2012. También se reportó en Escocia la disminución en los fagotipo 1, 2 y 49, junto con la aparición del fagotipo 21/28 (Pearce *et al.* 2009). En Irlanda, el fagotipo 32 es el más frecuente (Carroll *et al.* 2005), mientras que el fagotipo 21/28 rara vez se detecta fuera de las Islas Británicas (Byrne *et al.* 2015), además se asocia significativamente con SUH (Matthews *et al.* 2013).

Tabla 33. Distribución de fagotipos según el origen de aislamiento

Fagotipo	Total cepas por fagotipo	Humano n (%n/Total)	Bovino n (%n/Total)	Carne bovino n (%n/Total)	Ovino n (%n/Total)	Leche ovino n (%n/Total)	Caprino n (%n/Total)	Leche caprino n (%n/Total)	Silvestres n (%n/Total)
1	1	0	0	0	0	1 (4,8)	0	0	0
2	45	21 (15,5)	21 (26,9)	3 (18,7)	0	0	0	0	0
4	10	1 (0,7)	0	1 (6,2)	1 (4,5)	7 (33,3)	0	0	0
8	66	43 (31,8)	17 (21,8)	3 (18,7)	0	3 (14,3)	0	0	0
14	18	10 (8,9)	3 (3,8)	0	5 (22,7)	0	0	0	0
20	1	0	0	0	0	1 (4,8)	0	0	0
21	11	2 (1,5)	7 (9,0)	2 (12,5)	0	0	0	0	0
21var	1	0	0	1 (6,2)	0	0	0	0	0
23	4	1 (1,5)	3 (3,8)	0	0	0	0	0	0
26	2	1 (1,5)	1 (1,3)	0	0	0	0	0	0
27	4	3 (2,2)	1 (1,3)	0	0	0	0	0	0
28	1	0	0	1 (6,2)	0	0	0	0	0
31	4	3 (2,2)	0	0	0	0	0	1 (100)	0
32	5	2 (2,2)	1 (1,3)	0	0	2 (9,5)	0	0	0
32var	6	4 (3,0)	0	0	0	0	2 (100)	0	0
34	13	8 (5,9)	3 (3,8)	1 (6,2)	1 (4,5)	0	0	0	0
34var	1	0	0	0	1 (4,5)	0	0	0	0
39	4	3 (2,2)	1 (1,3)	0	0	0	0	0	0
42	1	0	0	1 (6,2)	0	0	0	0	0
45	2	0	2 (2,6)	0	0	0	0	0	0
50	1	1 (0,7)	0	0	0	0	0	0	0
51	2	1 (0,7)	1 (1,3)	0	0	0	0	0	0
54	36	13 (9,6)	7 (9,0)	2 (2,6)	8 (36,4)	4 (19,0)	0	0	2 (100)
54v	1	1 (0,7)	0	0	0	0	0	0	0
54var	4	0	0	0	2 (9,1)	2 (9,5)	0	0	0
63	3	1 (0,7)	1 (1,3)	0	1 (4,5)	0	0	0	0
63var	1	0	0	0	1 (4,5)	0	0	0	0
83var	1	1 (0,7)	0	0	0	0	0	0	0
87	2	1 (0,7)	0	0	0	1 (4,8)	0	0	0
Atípico	26	14 (10,4)	9 (11,5)	1 (6,2)	2 (9,1)	0	0	0	0
TOTAL	277	135	78	16	22	21	2	1	2

En rojo los fagotipos indentificados en ≥ 10 cepas y que englobaron el 68,2% de las 277 cepas ECVT O157

Al igual que Adams *et al.* (2016), nosotros también observamos una disminución en la prevalencia del fagotipo 2, pasando de un 25,8% en el período 1980-1999 a un 4,8% en el período 2000-2009. Por el contrario, el fagotipo 8 aumentó, pasando de un 19,9% a un 28,6% en los mismos períodos (Tabla 34 y Figura 18). Nuestros resultados indicaron un aumento en la detección del fagotipo 54 pasando de un 6,6% a un 20,6%. Durante el período 1980-1999 identificamos el fagotipo 54 principalmente en heces de ganado bovino; sin embargo, en el período 2000-2009 lo identificamos mayoritariamente en cepas aisladas de casos clínicos humanos, de leche de oveja y ciervo (Tabla 34 y Figura 18). La disminución observada del fagotipo 2 y el aumento del 54 entre ambos periodos resultaron ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Es importante resaltar que tanto en España como en otros países, los fagotipos predominantes entre las cepas de origen bovino son también los más comunes entre las cepas aisladas de seres humanos, lo que es coherente con el hecho de que el ganado bovino está reconocido como el principal reservorio (Mora *et al.* 2004).

Tabla 34. Distribución de los principales fagotipos según el periodo de aislamiento

	Fagotipo	Nº de cepas aisladas (%)	Humano	Origen bovino	Carne picada	Origen ovino/caprino	Leche oveja	Silvestres
Período 1980-1999	2	39 (25,8%)	16	21	2	0	0	0
	4	3 (2%)	1	0	1	1	0	0
	8	30 (19,9%)	12	17	1	0	0	0
	14	14 (9,3%)	9	3	2	0	0	0
	21/28	10 (6,6%)	1	7	2	0	0	0
	34	4 (2,6%)	1	3	0	0	0	0
	54	10 (6,6%)	3	7	0	0	0	0
	otros	41 (27,2%)	17	20	2	2	0	0
	TOTAL ANALIZADOS	151 (100%)	60	78	10	3	0	0
Período 2000-2009	2	6 (4,8%)	5	0	1	0	0	0
	4	7 (5,5%)	0	0	0	0	7	0
	8	36 (28,6%)	31	0	2	0	3	0
	14	4 (3,2%)	1	0	0	3	0	0
	21/28	2 (1,6%)	1	0	1	0	0	0
	34	9 (7,1%)	7	0	1	1	0	0
	54	26 (20,6%)	10	0	2	8	4	2
	Otros	36 (28,6%)	20	0	1	8	7	0
	TOTAL ANALIZADOS	126 (100%)	75	0	8	20	21	2

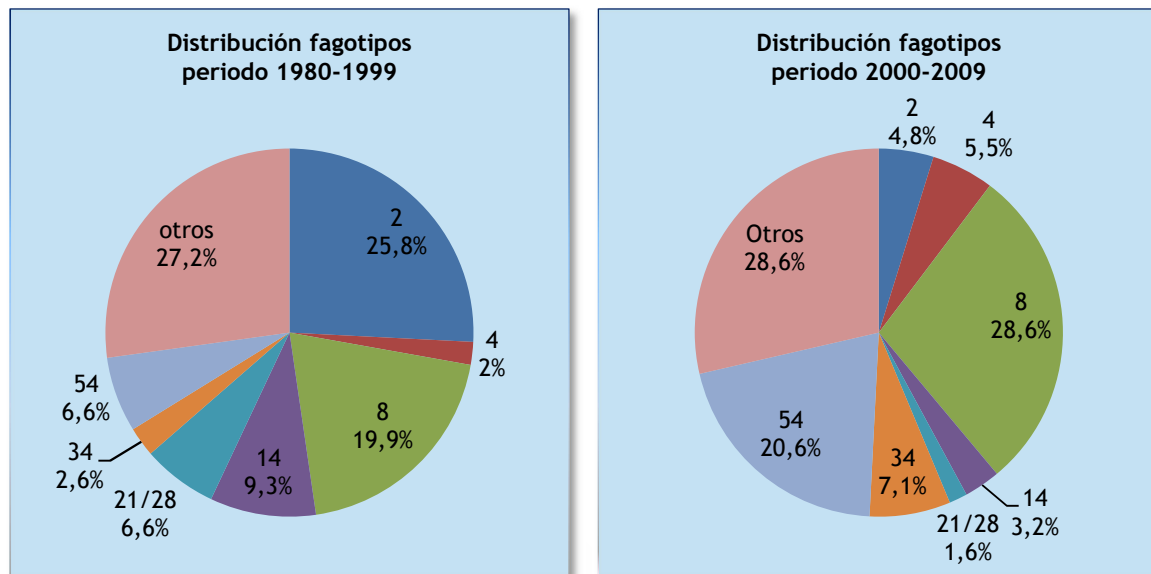


Figura 18. Distribución de fagotipos según período de aislamiento de las cepas

Como conclusión, confirmamos que las cepas ECVT O157 están presentes en diferentes reservorios de nuestra área sanitaria y de diferentes partes de la geografía española. A pesar de la diversidad genética que muestran sus perfiles de restricción, la mayoría de las cepas pertenecen a la ST11 y presentan un perfil de virulencia conservado (*eae-γ,1 vt1a, vt2a, vt2c, E-hlyA, katP, stcE*). Por la similitud encontrada en nuestros análisis, ganado bovino, ovino y animales silvestres son reservorios potenciales de las cepas implicadas en patología humana, y los alimentos derivados (leche y carne) actuarían como potenciales transmisores. En este estudio se describen por primera vez 5 de las 6 ST asociadas a este serotipo de ECVT (ST1799, ST1804, ST1825, ST1826, ST1833).

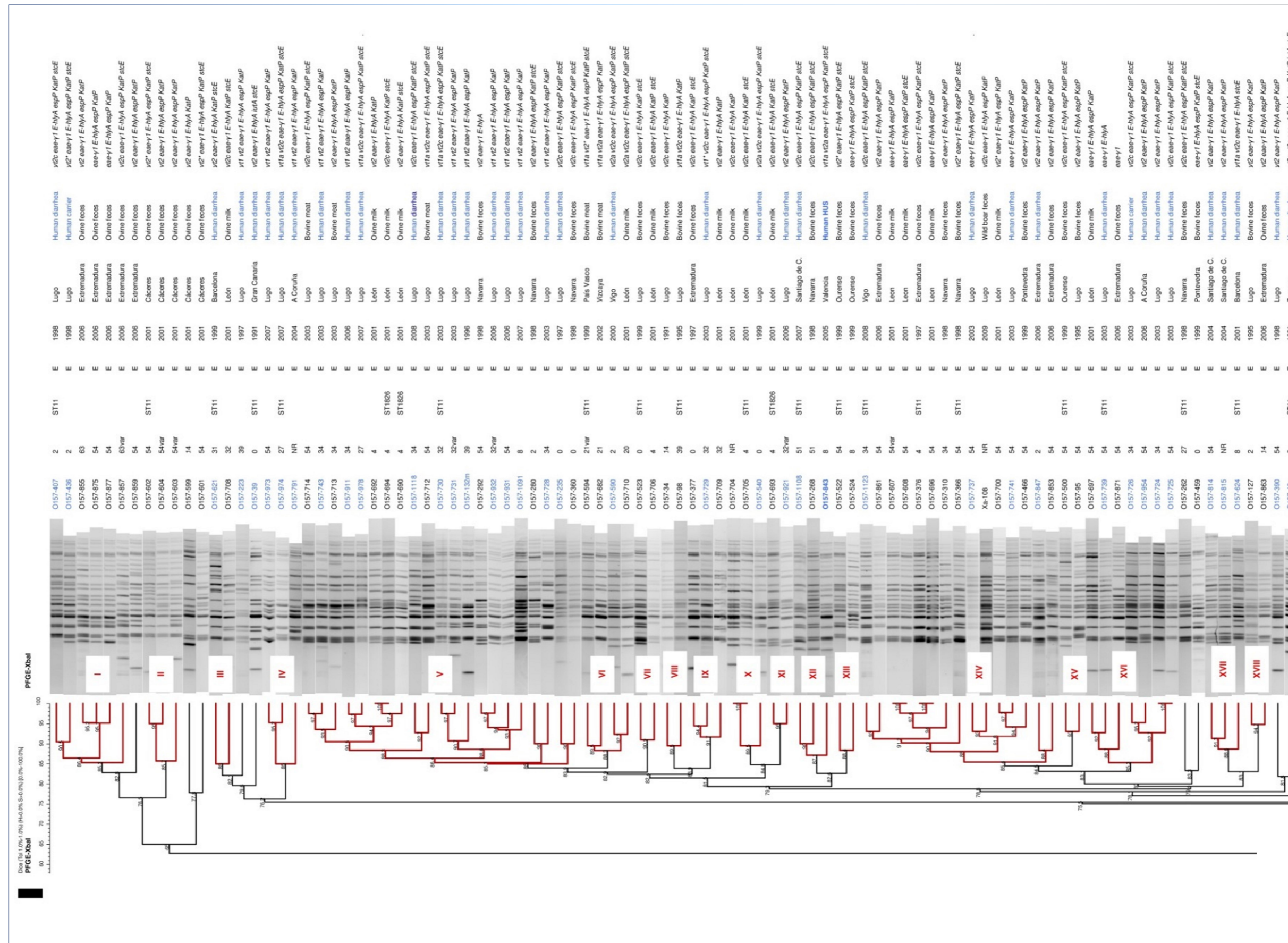


Figura 19. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 289 cepas ECVT O157:[H7]

Continúa en página siguiente

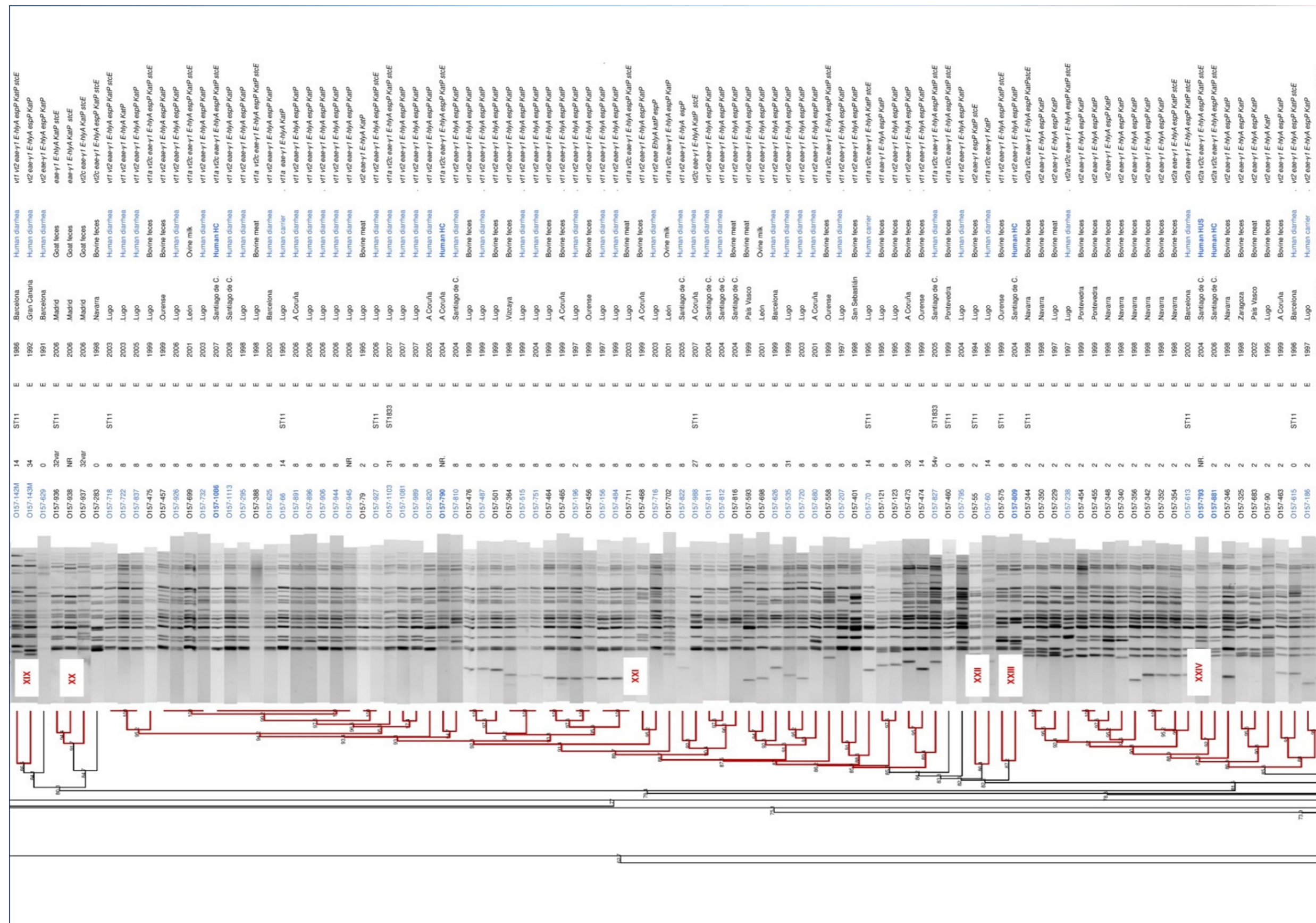


Figura 19. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 289 cepas ECVT O157:[H7]

Continúa en página siguiente

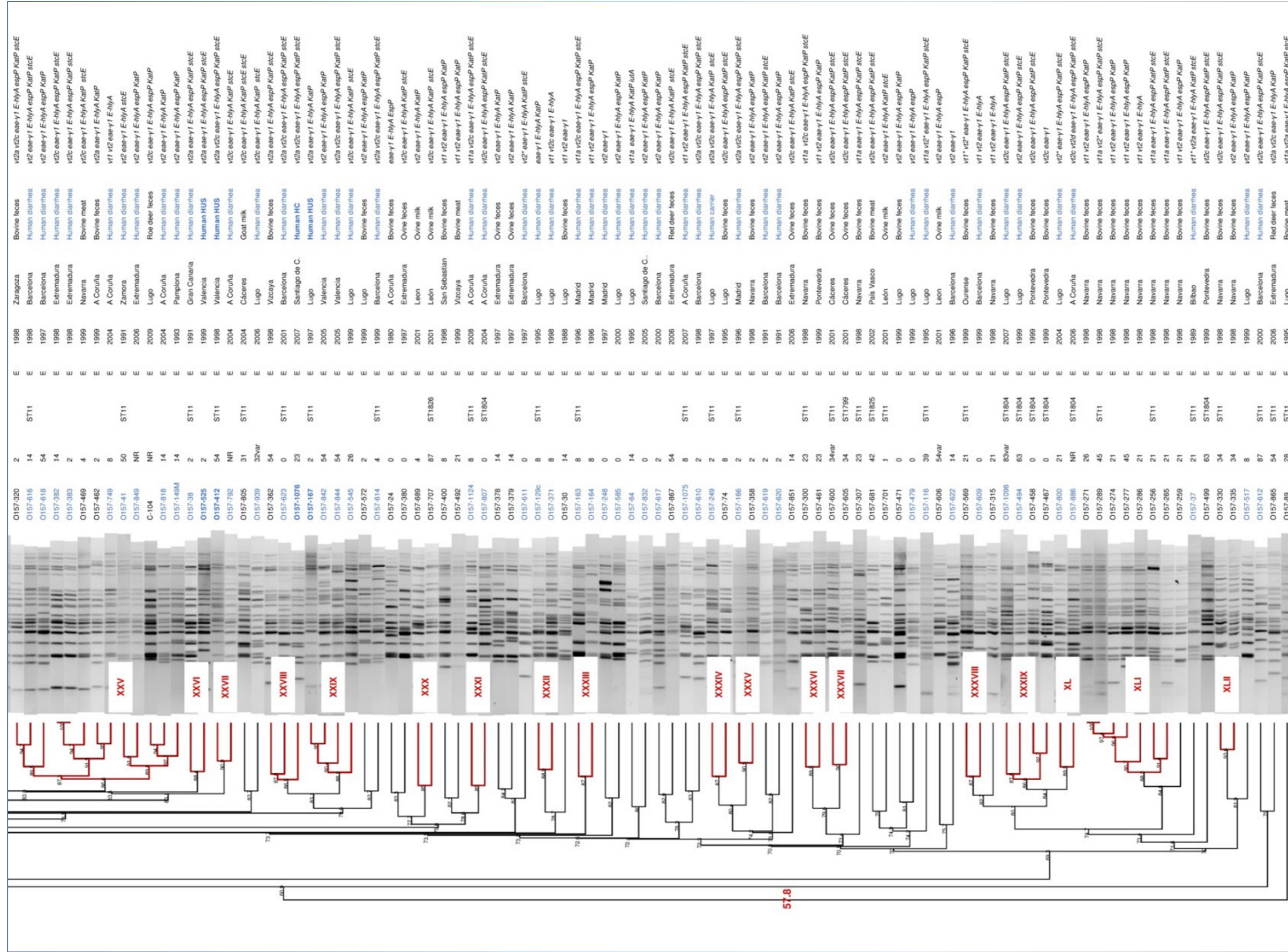


Figura 19. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 289 cepas ECVT 0157:[H7]. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, fagotipo, ST, filogrupo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. Hay que indicar que todas las cepas O157:[H7] incluidas en este estudio eran originariamente positivas para los genes *vt1*, O157-611, O157-116, O157-800, O157-289, O157-366, O157-436, O157-522, O157-594, O157-601, O157-602, O157-700, originariamente *vt2*; O157-569 originariamente *vt1*; O157-569 originariamente *vt2*; O157-569 originariamente *vt1* y *vt2*. El subgrupo de las verotoxinas fue realizado a cepas representativas de todos los clústeres. Asimismo, solo se analizó una selección de 136 cepas para el gen *stx2* y de 72 cepas para el gen *iutA*.



4.5.2. Grupo clonal O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29

En el presente estudio se incluyeron 125 cepas del serogrupo O26. Sesenta y tres de las 125 eran de origen clínico humano, 34 de heces de ganado bovino, 9 de heces de ganado ovino, 6 de carne de vacuno, 8 de leche de oveja y 5 de animales silvestres (4 de corzo y 1 de jabalí) aisladas entre los años 1987 y 2009 en diferentes zonas geográficas españolas, si bien todos los aislamientos de origen humano procedían del hospital de nuestra ciudad (Tabla 19).

Dentro de este serogrupo se determinaron mediante caracterización fenotípica y molecular 2 serotipos (O26:[H11] y O26:HNM). En cuanto a los genes asociados a la virulencia, el 100% de las cepas fueron positivas para el gen *eae* (subtipo *eae*- β 1) y el 70% (88 cepas) fueron positivas para *vt*. Dentro de las que resultaron positivas para los genes codificadores de las verotoxinas, la mayoría (85 cepas) fue *vt1* (del subtipo *vt1a*), y 4 cepas *vt2* (3 cepas *vt2a* y 1 que no pudo ser tipificada). Otros genes prevalentes en este grupo fueron *E-hlyA* (87 cepas), *katP* (71 cepas), *espP* (70 cepas), *iutA* (100 cepas). Ninguna de las cepas O26:[H11]/HNM analizadas resultó positiva para los genes *subAB*, *stcE* o *saa*. En este grupo clonal se analizaron adicionalmente los genes *cnf* (3 cepas positivas para *cnf3*), el gen de la α -hemolisina *hlyA* (10 cepas positivas), y el gen *bfp* (ninguna cepa positiva).

La mayoría de las cepas O26:[H11]/HNM de nuestro estudio (122 de las 125) resultaron ser fermentadoras de sorbitol y positivas para la β -glucuronidasa (118 de las 125). También la mayoría (120 cepas) crecieron en MACSTC, de las que 119 resultaron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito. Se realizó además el test de fermentación de los azúcares ramnosa y dulcitol, resultando positivas 13 y 24 cepas, respectivamente (Tabla 27 y Figura 20).

En esta colección se ha definido un único grupo clonal en base a filogrupo y ST (O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29) puesto que las 2 ST determinadas (ST21 y ST29) constituyen SLV con una única diferencia alélica en el gen *adK* (Tabla 30). El dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 125 cepas O26:[H11]/HNM (Figura 20) mostró una identidad global del 63%. Dentro de esta variabilidad se apreció una clara distribución en 2 grupos: todas las cepas positivas para *vt1*, *vt2*, *E-hlyA*, *katP*, *espP*, *iutA* en el Grupo A (similitud 65,3%); y todas las cepas positivas para la α -hemolisina (*hlyA*) en el Grupo B (similitud 69,9%). Se detectaron un total de 27 clústeres de similitud >85%, de los cuales 11 incluían cepas aisladas de patología humana y de otros orígenes (clústeres I, II, III, VI, VIII, IX, XIV, XV, XVI, XVII, XXVI). Destaca el clúster II con 23 cepas de origen humano, ovino y bovino (alimentos y portadores en ambos casos). Además se detectaron cepas aisladas de animales silvestres (corzo) con alta similitud con cepas de origen humano (clústeres III, VI, VIII). En la Figura 21 se muestran con más detalle las 34 cepas correspondientes a los clústeres II a V (82,6% de identidad), en los que se pueden apreciar como cepas de origen clínico humano tenían una similitud >85% con cepas de origen bovino

y ovino, así como 1 cepa aislada de heces de un jabalí formando clúster (identidad >85%) con cepas aisladas de heces de ganado bovino.

Las cepas de *E. coli* del serogrupo O26 se clasificaron originalmente como ECEP por su asociación con brotes infantiles de diarrea en 1940 (Orskov, 1951; Levine, 1987). Más tarde, Konowalchuck *et al.* (1977) observaron que algunas cepas O26 tenían actividad tóxica para las células vero. Análisis posteriores de los genes de virulencia en *E. coli* O26 mostraron la existencia de 2 grupos: los ECEP O26 que se caracterizan por la presencia de la isla de patogenicidad LEE y, por otro lado, los ECVT O26 que se caracterizan por ser cepas que además de portar la isla LEE, poseen los genes que codifican para las verotoxinas VT1 y/o VT2 (Leomil *et al.* 2005; Jenkins *et al.* 2008). Se han aislado cepas del serogrupo O26 pertenecientes a uno u otro patotipo (ECVT y ECEP) de casos clínicos humanos en diferentes zonas del mundo (Elliot *et al.* 2001; Paciorek, 2002; Jelacic *et al.* 2003; Vaz *et al.* 2004), asociadas frecuentemente con CH y SUH. Como consecuencia, estas cepas fueron incluidas en el grupo definido como enterohemorrágico (ECEH) junto con otros serogrupos como el O157, O103, O111 y O145 (Nataro y Kaper 1998).

En el estudio de Leomil *et al.* (2005) se detectaron los 2 grupos de cepas O26 referenciados en el apartado anterior. Analizaron 23 cepas O26:H11 aisladas en Alemania y Brasil de origen clínico humano y de animales entre los años 1947-2003. Encontraron un grupo constituido por cepas ECVT y ECEP no fermentadoras de ramnosa ni dulcitol, y que eran portadoras del plásmido ECEH asociado a los genes *E-hlyA*, *katP*, *espP* e *iutA*; y un segundo grupo de cepas ECEP O26:HNM portadoras del plásmido que codifica para la α -hemolisina, pero negativas para el plásmido de ECEH asociado a la enterohemolisina, capaces de fermentar los azúcares ramnosa y dulcitol. En concordancia con estos resultados, nosotros también observamos estos 2 grupos en las cepas de nuestra colección O26. Por un lado un grupo de 113 cepas en el que la mayoría eran verotoxigénicas y productoras de enterohemolisina; dentro de este grupo, la mayoría de cepas (94 cepas) pertenecía al serotipo O26:H11 y el resto eran del serotipo O26:HNM. Por otro lado, detectamos un segundo grupo de 12 cepas que no eran verotoxigénicas y tampoco productoras de enterohemolisina, todas ellas pertenecían al serotipo O26:HNM y eran negativas para los genes *katP*, *espP*, *iutA*; estas cepas fueron negativas asimismo para el gen *bfp* (*bundle forming pili*), por lo que se trataría de cepas ECEP atípicas (ECEPa). Dentro de este grupo de ECEPa, 10 cepas fueron productoras de α -hemolisina y 8 de ellas fermentadoras de los azúcares ramnosa y dulcitol; adicionalmente 2 fermentaron únicamente la ramnosa. Es probable que ambos grupos de cepas O26 tengan un ancestro común, el O26:H11-*eae- β 1*, que haya evolucionado en 2 linajes, por un lado el O26:[H11] ECEP/ECVT no fermentador de ramnosa y dulcitol y por otro lado el O26:HNM ECEP fermentador de ramnosa y dulcitol (Leomil *et al.* 2005).

Entre las cepas ECVT no O157, el serotipo O26:H11 ha emergido como el serotipo más común asociado con diarrea y SUH en todo el mundo (Gerber *et al.* 2002; Tozzi *et al.* 2003;

Beutin *et al.* 2004; Brooks *et al.* 2005; Vally *et al.* 2012; Bielaszewska *et al.* 2013; Gould *et al.* 2013). Se han descrito altas tasas de prevalencia de ECVT O26 en pacientes con SUH y diarrea en numerosos países: República Checa (Bielaszewska *et al.* 1996.), Dinamarca (Ethelberg *et al.* 2004), Finlandia (Eklund *et al.* 2001), Italia (Tozzi *et al.* 2003), Suiza (Käppeli *et al.* 2011) y España (Blanco *et al.* 2004; Mora *et al.* 2011). Además, los datos de asociación de ECVT O26 y SUH o diarrea en América del Norte (Jelacic *et al.* 2003; Brooks *et al.* 2005; Gilmour *et al.* 2005; Hedican *et al.* 2009), América del Sur (Vaz *et al.* 2004; Rivas *et al.* 2006a), Australia (Elliott *et al.* 2001) y Asia (Hoshina *et al.* 2001; Hiramatsu *et al.* 2002) evidencian la importancia mundial del ECVT O26. Shen *et al.* (2015) también observaron que el O26:H11 fue uno de los más frecuentemente detectados en casos clínicos humanos en EE.UU. en un estudio realizado entre los años 2002 y 2010 en el que analizaron 359 muestras de distintos orígenes de aislamiento (alimentos, animales y humanas). Del mismo modo, en el período 2010-2014, 19 países de la UE detectaron 2.356 casos confirmados de ECVT O26, la mayoría de los cuales se observaron en Irlanda, seguido de Alemania y Suiza (EFSA-ECDC, 2016). Entre los O26 el serotipo más común implicado en brotes es el O26:H11 (Kaspar *et al.* 2010). De los brotes más recientes por O26:H11 destacan el de una guardería de Colorado en el año 2011 (Brown *et al.* 2012), otro en Bélgica en el año 2007 asociado a helados (De Schrijver *et al.* 2008) y otro también en el año 2007 en Dinamarca asociado a salchichas de ternera (Ethelberg *et al.* 2007). Más recientemente, en el año 2012, el ECVT O26 fue el causante de otro brote ocurrido en 11 estados de EE.UU., en el que 29 personas resultaron afectadas, 7 de las cuales tuvieron que ser hospitalizadas aunque ninguna de ellas llegó a desarrollar el SUH; el brote fue asociado al consumo de brotes germinados de trébol crudo (CDC, 2012c). En nuestro país, también hemos identificado el O26:H11 entre los serotipos más frecuentemente asociados a cepas de ECVT aisladas de casos clínicos humanos en Lugo en los estudios realizados entre 1992 y 1999 (Blanco *et al.* 2004; Mora *et al.* 2011) y entre los años 2003-2013 (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar).

En cuanto a los reservorios, el ganado vacuno puede ser portador de cepas O26 ECVT y EPEC que pueden causar enfermedades graves en los seres humanos (Jeon *et al.* 2006; Sasaki *et al.* 2012; Paddock *et al.* 2013b). Las cepas EPEC y ECVT O26 también se aíslan frecuentemente de ganado porcino, ovino, caprino, conejos y pollos (Rios *et al.* 1999; Cid *et al.* 2001; Kobayashi *et al.* 2001; Mercado *et al.* 2004; Krause *et al.* 2005) y también se han aislado de productos cárnicos de origen animal (Hussein y Sakuma, 2005; Dambrosio *et al.* 2007) y productos lácteos (Steele *et al.* 1997). El ECVT O26 también ha sido asociado a diarrea y disentería en terneros (Sherwood *et al.* 1985; Mainil *et al.* 1987; Caprioli *et al.* 1993; Blanco *et al.* 1994; Paton y Paton, 1999; Sandhu y Gyles, 2002; Lee *et al.* 2008). Además, se conoce que algunas cepas O26 tienen la capacidad de sobrevivir en los hospedadores y granjas durante largos periodos de tiempo con el consiguiente riesgo para los humanos (Geue *et al.* 2009); por ejemplo, los ECVT O26 pueden sobrevivir en las heces del ganado bovino 18 semanas a 15 °C (Fukushima *et al.* 1999) y también pueden sobrevivir en suelos abonados con estiércol durante largos periodos de tiempo entre 4 y 20 °C (Fremaux *et al.* 2008). En España hemos aislado

cepas ECVT O26 en ganado bovino con los antígenos HNM, H11, siendo el serotipo O26:H11 el más frecuente en un estudio realizado en 514 cepas ECVT aisladas de ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c). Aunque en menor proporción, también detectamos el ECVT O26:H11 en ganado ovino (Blanco *et al.* 2003b; Horcajo *et al.* 2010), sin embargo no se detectaron ECVT O26 en amplios estudios realizados en caprino (Orden *et al.* 2003, 2008; Rey *et al.* 2003). En alimentos, también detectamos el serogrupo O26 en 15 cepas (1 O26:H8; 11 O26:H11; 2 O26:HNM; 1 O26:H42) de las 149 ECVT aisladas de carne picada de vacuno en la ciudad de Lugo, analizadas entre 1995-2009 (Mora *et al.* 2007a; Herrera, 2015). En otro estudio, realizado por nuestro grupo entre los años 2009-2012, aislamos 4 ECVT O26:H11, 2 de carne de vacuno y 1 ECVT O26:H11 de carne de porcino y 1 de pechuga de pollo, sin embargo, no aislamos el ECVT O26 en productos agrícolas ni en productos lácteos entre las 1.253 muestras analizadas (Herrera, 2015).

También en la fauna silvestre se han aislado cepas de ECVT O26. En un estudio realizado en Galicia entre los años 2009 y 2010 (Mora *et al.* 2012a) detectamos las 5 cepas ECVT O26:H11, incluidas en la presente tesis, entre 701 muestras de heces procedentes de jabalíes, corzos y lobos. Miko *et al.* (2009) detectaron ECVT O26 en carne de animales silvestres en un estudio realizado en Alemania entre los años 1998 y 2006, con 2 aislamientos de carne de liebre y 1 de carne de ciervo entre las 140 cepas ECVT recuperadas; y lo que es más importante, en este estudio compararon las cepas aisladas de carne de animales silvestres con cepas de otros orígenes de aislamiento y observaron que las cepas ECVT O26:H11 de carne de animales silvestres formaban clúster (>85% de identidad) con cepas aisladas de carne de ganado bovino y con cepas aisladas de casos clínicos humanos. Hemos encontrado también similitud entre los aislados de fauna silvestre y las cepas ECVT O26 de otros orígenes; de hecho, las 5 cepas forman clúster (>85% similitud) con cepas de origen clínico humano, de heces de ganado bovino con diarrea, de carne de ganado vacuno y de heces de ganado ovino (clústeres III, V, VI y VIII; Figura 20).

El ECVT O26 representa un grupo evolutivamente muy dinámico, que genera rápidamente nuevos clones patógenos (Zhang *et al.* 2000b; Bielaszewska *et al.* 2007b). Ejemplo de ello es la emergencia de un clon altamente virulento de ECVT O26:H11/HNM en Alemania a mediados de 1990, portador del gen que codifica para la verotoxina VT2a (Zhang *et al.* 2000b). Estas cepas se han ido identificando de forma creciente en EE.UU. (Misselwitz *et al.* 2003; Brooks *et al.* 2005) y Europa (Allerberger *et al.* 2003; Käppeli *et al.* 2011). Se ha planteado la hipótesis de que las cepas O26 portadoras del gen *vt2* son más virulentas y se asocian con un mayor riesgo de SUH, en comparación con las cepas que son predominantes en el ganado bovino y sólo portan *vt1* (Bielaszewska *et al.* 2013). Por otro lado, en Argentina la mayoría de las cepas aisladas de animales, alimentos y muestras clínicas son portadoras de los subtipos *vt1a* y/o *vt2a* (Krüger *et al.* 2015). Curiosamente, el ECVT O26:H11 portador del subtipo *vt2a*, raramente detectado en ganado bovino en otros países, constituye una parte importante de las cepas O26:H11 que circulan en el ganado y los alimentos en Argentina

(Krüger *et al.* 2015). Krüger *et al.* (2015) observaron que las cepas ECVT O26:H11 que circulan en Argentina, incluyendo las aisladas de seres humanos, ganado bovino y productos cárnicos, presentan un alto potencial patógeno, y sugieren que el ganado bovino puede ser un reservorio de cepas O26:H11 portadoras de *vt2a*. La virulencia del O26:H11 *vt2* positivo podría diferir del O26:H11 *vt1*, que parece estar asociado con presentaciones clínicas más moderadas (Ethelberg *et al.* 2009). En España, hemos detectado este tipo de cepas con muy baja frecuencia; de hecho, en nuestra colección de 125 cepas únicamente detectamos 4 cepas ECVT O26 *vt2*: 1 aislada de un caso clínico humano con diarrea de 1998 (*vt2a*), 2 aisladas en 1997/1998 de heces ovinas (*vt1a vt2a*) y 1 de origen ovino aislada en 1997 que finalmente perdió el gen *vt2*.

Las 125 cepas ECVT O26 de nuestro estudio mostraron 2 ST diferentes. En la base de datos de Enterobase (http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search) se puede visualizar que en la predicción de los serotipos asociados a los genomas ST21 ensamblados en esta plataforma se obtienen los siguientes resultados: O26:H11, O103:H11, O118 *or* O151:H16; O123 *or* O186:H11. Por otro lado, en la predicción de los serotipos asociados a los genomas ST29 ensamblados en Enterobase se detecta una mayor heterogeneidad (O26:H8, O26:H11, O34:H9, O109:H11, O111:H25, O118 *or* O151:H9, O119:H8, O128:H8, O177:H11, O186 *or* O123:H11). Entre las cepas ECVT de la presente tesis, también determinamos la ST21 asociada al grupo clonal O118:H16/HNM-B1-ST21 (Tabla 30). Hemos comparado los perfiles de macrorrestricción de los 2 grupos clonales ST21 y constatamos que las 13 cepas O118:H16/HNM-B1-ST21 se distribuyeron en el dendrograma con las 125 cepas O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29, formándose 3 pequeños clústeres de identidad >85% con cepas de ambos grupos (ver discusión en el apartado 4.6.2.1. Estructura y relaciones genéticas de la población de ECVT). Tanto el análisis comparativo de los perfiles de macrorrestricción, como los perfiles genéticos (todas las cepas O26 y O118 son *vt1a eae-β1 iutA*) y filogenéticos señalarían el origen clonal común, con una diversificación genética posterior.

Eichhorn *et al.* (2015) analizaron las relaciones filogenéticas en una colección de 250 cepas pertenecientes a los principales serogrupos definidos como enterohemorrágicos (ECEH): O26, O103, O111 y O145 de distintos orígenes de aislamiento, y determinaron que más del 40% se agrupaban dentro del ST29 Cplx. Igual que nosotros encontramos que las cepas ECVT y ECEPa se agrupaban mostrando la estrecha relación de estos patotipos. Se ha sugerido para aislamientos O26 el concepto de interconversión entre ECVT O26 y ECEPa por la pérdida, así como por la ganancia, de los profagos *vt* a través de la conversión lisogénica (Bielaszewska *et al.* 2007b). Aplicando el concepto de conversión bidireccional (la posible pérdida y ganancia de elementos genéticos móviles) a los aislamientos dentro de ST29 Cplx, se podría hipotetizar que las cepas ECEP podrían funcionar como cepas pre-ECVT que integran nuevamente el profago *vt* en sus genomas. Por otro lado, las cepas ECEP también pueden ser cepas ECVT que han perdido el bacteriófago *vt* y, simultáneamente, la capacidad de secretar VT.

El análisis filogenético llevado a cabo por Bletz *et al.* (2013) de cepas ECVT O26:H11/HNM aisladas de portadores asintomáticos y de pacientes con diarrea o SUH entre los años 1965 y 2012 sugiere un modelo evolutivo en el que existe una población estable de cepas O26 en un nicho y sólo unas pocas cepas con ventajas evolutivas son transferidas a un nuevo nicho. Estos nuevos nichos podrían explicar la emergencia de las cepas altamente virulentas de *E. coli* O26 (Bletz *et al.* 2013). Por otro lado, Norman *et al.* (2015) apoyan la hipótesis de que existe una población de cepas O26 no patógenas en el ambiente que por selección se han adaptado al ganado bovino. Estas cepas pueden haber adquirido factores de virulencia antes o después de adaptarse al ganado bovino como resultado de presiones selectivas y posteriormente, estas cepas virulentas pueden pasar a los seres humanos donde causarían infecciones.

Aunque nosotros únicamente aislamos cepas ECVT de este serogrupo en pacientes con diarrea, los serotipos O26:H11/HNM están comúnmente asociados a SUH y a brotes (Misselwitz *et al.* 2003; Kaspar *et al.* 2010), por lo que se le asignó el seropatotipo B de la clasificación de Karmali *et al.* (2003).

Por tanto, nuestros resultados indicarían que el grupo clonal O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29 está ampliamente diseminado en el área sanitaria de Lugo, y que el ganado vacuno en nuestra Comunidad, y el ovino en otras partes de España, juegan un papel epidemiológico importante en el mantenimiento y transmisión de este tipo de ECVT al hombre, dada la similitud demostrada entre los perfiles de macrorrestricción de las cepas de origen clínico humano, bovino y ovino. Además, es importante destacar que en nuestra Comunidad la fauna silvestre también podría actuar como un importante reservorio de este tipo de cepas, dada la alta similitud encontrada con los perfiles de macrorrestricción de cepas de origen clínico humano. Nosotros corroboramos, al igual que otros autores, la relación filogenética entre los patotipos ECVT y ECEPa del serogrupo O26.

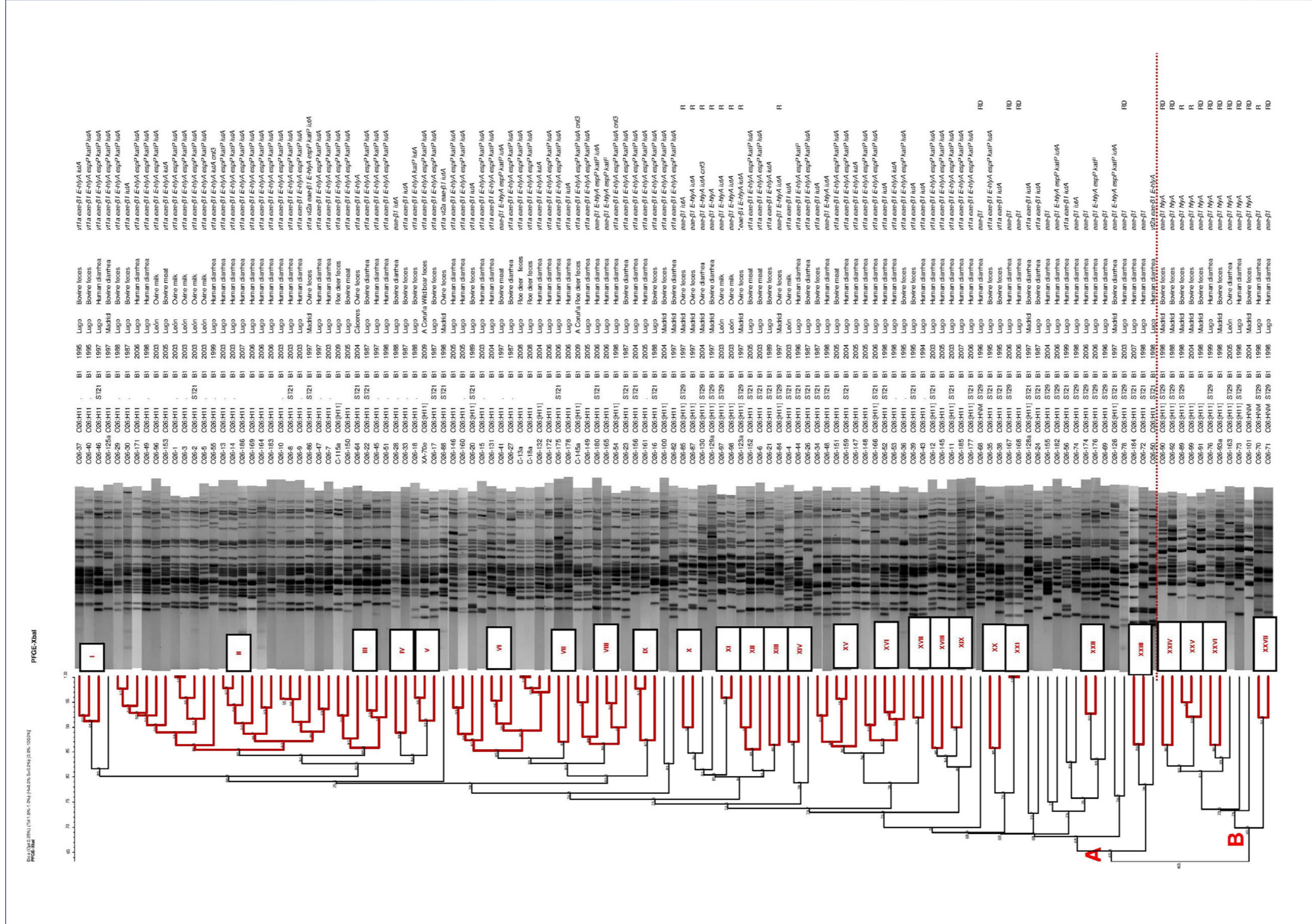


Figura 20. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 125 cepas ECVT O26:[H11]/HNM. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia, fermentación de L-ramnosa (R) y dulcitol (D). *O26-123a originariamente vtZ positiva



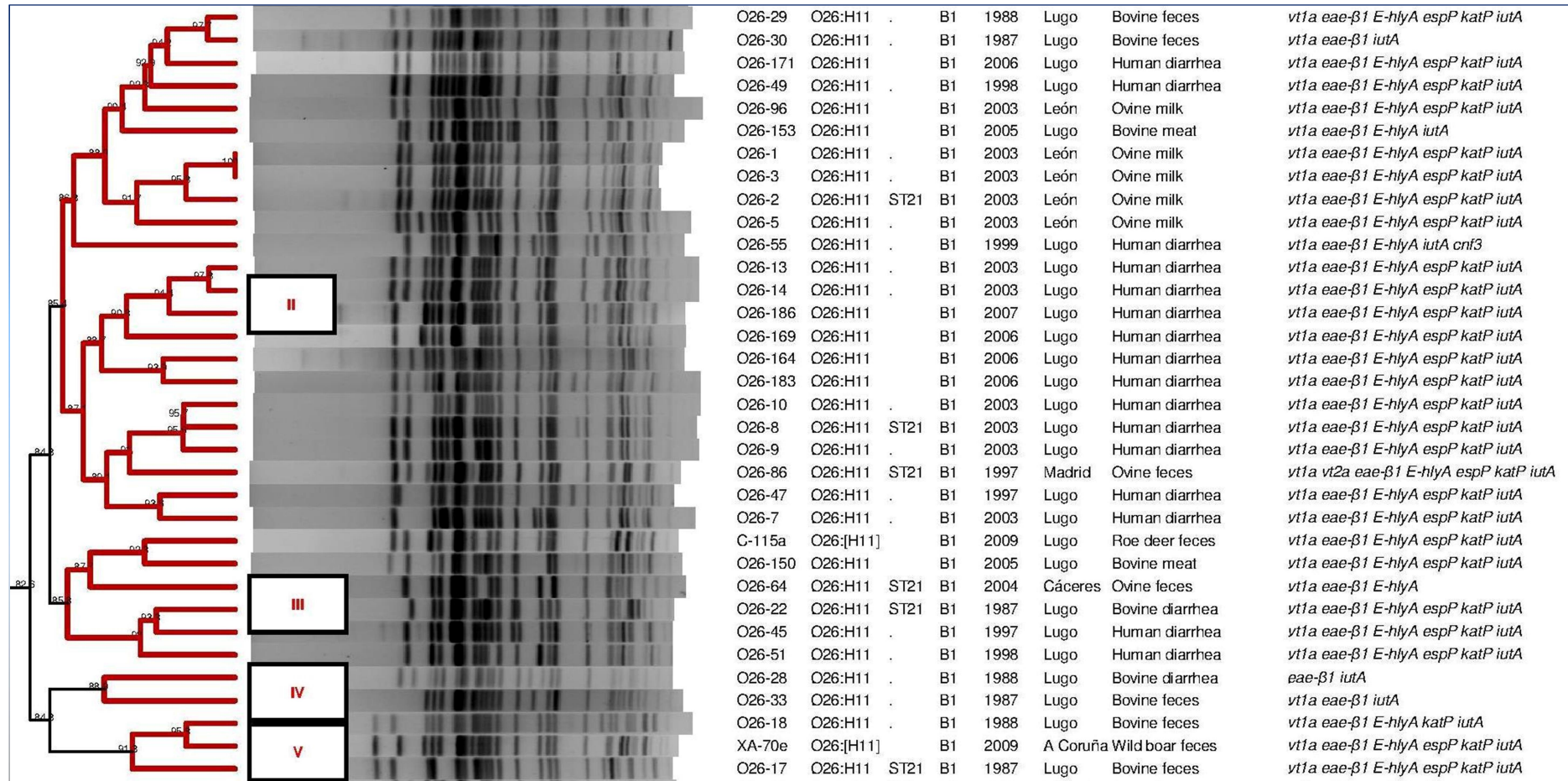


Figura 21. Detalle del dendrograma de la Figura 20 en el que se aprecian las cepas de los clústeres II-V

4.5.3. Grupos clonales O146:[H21]-B1-ST442 y O146:[H28]-F-ST738

En el presente estudio se incluyeron 119 cepas del serogrupo O146. Dieciocho de las 119 cepas eran de origen clínico humano, 1 de heces de ganado bovino, 31 de heces de ganado ovino, 12 de heces de ganado caprino, 49 de heces de animales silvestres (incluidos 44 de cérvidos, 4 de jabalí y 1 de zorro) y 8 de alimentos (1 de carne de vacuno, 5 de leche de oveja y 2 de lechuga) (Tabla 19).

Mediante serotipado y tipificación molecular determinamos 2 serotipos (O146:[H21] y O146:[H28]), que en base a su serotipo, filogrupo y ST definieron 2 grupos clonales (O146:[H21]-B1-ST442 y O146:[H28]-F-ST738) claramente diferenciados (Figura 22, Figura 23, Figura 24).

Concretamente, el grupo clonal O146:[H21]-B1-ST442 incluye 100 cepas aisladas entre los años 1994 y 2011, de diferente origen geográfico (Extremadura, Murcia, León y Galicia) y de aislamiento (heces de ganado ovino, caprino, bovino, animales silvestres y humanos; leche de ganado ovino y lechugas). En la caracterización de sus genes de virulencia encontramos que la mayoría de las cepas O146:[H21] eran positivas para los genes *vt1c* (85 cepas), *vt2b* (88 cepas), *E-hlyA* (76 cepas) e *iutA* (70 cepas); adicionalmente 1 cepa era portadora de *vt2a* y 1 cepa originariamente *vt1* perdió el gen, por lo que no pudo ser tipificada. Todas las cepas de este grupo clonal resultaron negativas para los genes *eae*, *katP*, *espP*, *saa*, *stcE*, *subAB* (su variante plasmídica). Además se analizó un grupo representativo de cepas para la variante cromosómica del gen *subAB*, 56 de las 59 (95%) cepas analizadas para este gen resultaron positivas y figuran en el dendrograma en negrita (su código de cepa) como *subAB** (Figura 22). Con la excepción de 1 cepa, las O146:[H21] crecieron en MACSTC y fueron positivas para los genes *terB/D* de resistencia al telurito; 5 cepas resultaron no fermentadoras del sorbitol y 3 negativas para la β -glucuronidasa (Tabla 27).

En la Figura 22 se muestra el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de estas 100 cepas O146:[H21], que globalmente mostraron una similitud del 55,7%. A pesar de esta heterogeneidad, se detectaron 19 clústeres (I-XIX) con una identidad >85%, de los que 3 (clústeres I, VI y XI) incluían cepas de origen clínico humano junto con cepas de origen silvestre y ovino (clúster I), cepas de origen ovino (clúster VI) y cepas de origen bovino/ovino (clúster XI). En la Figura 23 se muestra el detalle de los clústeres I a VII del dendrograma anterior. Es de destacar que entre los clústeres VI y VII se agrupan 13 cepas con una identidad del 84,5%, incluyendo cepas de origen ovino, de productos agrícolas (lechuga) y de origen clínico humano, aisladas en diferentes zonas geográficas.

Por otro lado, identificamos el grupo clonal O146:[H28]-F-ST738 casi exclusivamente de cepas de origen animal, y específicamente silvestres (16 de heces de ciervo, 1 de corzo, 1 de gamo y 1 de origen clínico humano), aisladas entre los años 2007 y 2011, en Lugo y

Extremadura. Las 19 cepas de este grupo clonal eran portadoras de los genes *vt2b* y *E-hlyA*; solo 1 cepa era *vt1*, pero había perdido el gen por lo que no pudo subtiparse; todas las cepas de este grupo clonal resultaron negativas para los genes *eae*, *katP*, *espP*, *subAB* (variante plasmídica), *saa*, *iutA*, *stcE*. Adicionalmente, 4 de 8 cepas representativas analizadas para la variante cromosómica del gen *subAB* fueron positivas (figuran en negrita en el dendrograma) (Figura 24). El análisis de los perfiles de macrorrestricción de estas cepas identificó 4 pequeños clústeres (>85% de identidad) y globalmente las cepas mostraron únicamente un 64,8% de similitud.

Según la revisión de Bettelheim (2007), las cepas ECVT del serogrupo O146 se han descrito en humanos tanto sanos como enfermos (aunque mayoritariamente en enfermos). En un estudio llevado a cabo por Beutin *et al.* (2004) entre los años 1997 y 1999 en Alemania, detectaron el serotipo O146:H21 en 15 cepas y el O146:H28 en 7, de las 677 ECVT aisladas de casos clínicos. Años más tarde, el ECVT O146:H21 se encuentra entre los serotipos más frecuentemente reportados en los casos de infecciones humanas entre 2007-2010 (EFSA, 2013). En España, el ECVT O146 fue identificado por nuestro grupo en pacientes del HULA en un estudio realizado entre los años 1992 y 1999 (Blanco *et al.* 2004), en el que se aislaron 3 cepas del serotipo O146:H21 entre las 5.054 muestras analizadas. Posteriormente, en un segundo estudio realizado en este mismo hospital entre los años 2003-2013, se detectaron 18 cepas del serogrupo O146 entre las 391 cepas ECVT aisladas (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar).

En cuanto a los reservorios, el ECVT O146:H21 se ha aislado del ganado ovino en diferentes países como Brasil, Alemania y México (Vettorato *et al.* 2003; Beutin *et al.* 1997a; Amézquita-López *et al.* 2012) y, principalmente, de animales silvestres (alce, ciervo, corzo, jabalí) o sus productos (Miko *et al.* 2009; Franklin *et al.* 2013). En el caso del ECVT O146:H28, se describen como reservorios fundamentales los animales silvestres (Beutin *et al.* 2007; Miko *et al.* 2009; Eggert *et al.* 2012). En España se confirman los hallazgos de otros países, de manera que el aislamiento de cepas O146:H21 y O146:H28 está fundamentalmente asociado a pequeños rumiantes (Orden *et al.* 2003, 2008; Rey *et al.* 2003; Cortés *et al.* 2005) y a animales silvestres (distintos tipos de cérvidos, pero también jabalí) (Sánchez *et al.* 2009a, 2010a; Mora *et al.* 2012a; Alonso *et al.* 2017).

Al igual que nosotros, otros autores describen una alta variabilidad en los perfiles de PFGE de las cepas ECVT O146. Sánchez *et al.* (2009a), por ejemplo, encontraron una similitud menor al 60% en los perfiles de PFGE de los 25 aislamientos de ECVT O146 de animales silvestres abatidos en cacerías en un estudio realizado en Extremadura entre los años 2004 y 2005; o Leotta *et al.* (2006), que también encontraron un alto grado de polimorfismo entre 6 cepas ECVT O146:H28 aisladas de mamíferos no domésticos en cautiverio. Destaca asimismo el estudio llevado a cabo por Miko *et al.* (2009) en Alemania entre los años 1998 y 2006, en el que se compararon cepas aisladas de carne de animales silvestres con cepas de

animales de granja, de productos derivados de dichos animales, y con cepas de origen clínico humano. Igual que nosotros describieron una alta heterogeneidad entre las cepas ECVT O146, con solo un 69% de identidad global entre las O146:H21 y menos de un 75% entre las O146:H28. En su colección identificaron cepas de origen clínico humano y aisladas de carne de animales silvestres con más de un 85% de similitud pertenecientes al serotipo O146:H28.

Todas las cepas O146:H21/H28 de nuestra colección resultaron negativas para la variante plasmídica de la SubAB (denominada SubAB₁). Sin embargo, la variante de la SubAB localizada en el cromosoma (*subAB*₂) la detectamos en este estudio en 56 de las 59 cepas analizadas del serotipo O146:H21 y en 4 de las 8 cepas analizadas del serotipo O146:H28. Como ya se comentó en la introducción de esta tesis doctoral, además de las toxinas VT, los ECVT pueden sintetizar la adhesina intimina (codificada por *eae*), una enterohemolisina codificada por plásmido (*E-hlyA*) o una proteína autoaglutinante (*Saa*) entre otros factores de virulencia (Gyles, 2007). Además, la subtilasa (SubAB) es una citotoxina elaborada por algunas cepas de ECVT que generalmente carecen de la isla de patogenicidad LEE, asociada con letalidad en ratones y células humanas y la mejora de la supervivencia de *E. coli* en macrófagos (Paton *et al.* 2004). Se han descrito 4 variantes de SubAB: un operón *subAB*₁ transportado por plásmido, generalmente coubicado con el gen *saa*, y 3 variantes cromosómicas (*subAB*₂₋₁, *subAB*₂₋₂ y *subAB*₂₋₃). El operón *subAB*₂₋₁ se encuentra en la isla de patogenicidad cromosómica SEPAI, cerca del gen *tia* que codifica una invasina en el grupo de los *E. coli* enterotoxigénicos, mientras que el *subAB*₂₋₂ se encuentra junto a un gen que codifica una proteína de flujo de membrana externa y asociado a genes de un sistema de secreción de tipo I (Paton *et al.* 2004, Funk *et al.* 2013; Michelacci *et al.* 2013) y, por último, la variante *subAB*₂₋₃ que se asoció a un gen que codifica para una proteína de función aún desconocida y que se encuentra 527 pb después del locus *subAB* (Nüesch-Inderbinnen *et al.* 2015; Tasara *et al.* 2017). Nuestros hallazgos con respecto a la detección de la variante *subAB*₂ en las cepas ECVT O146:H21/H28 corroboran lo observado en estudios previos, como por ejemplo, el estudio llevado a cabo por Orden *et al.* (2011) en el que se analizaron 261 cepas ECVT aisladas entre los años 1993 y 2005, detectando dicho gen asociado al serotipo O146:H21/HNM en 12 cepas aisladas de ganado caprino y en 8 cepas O146:H21 aisladas de ganado ovino. Michelacci *et al.* (2013) identificaron la variante *subAB*₂ en las 19 cepas del serogrupo O146 aisladas de las 123 cepas ECVT que analizaron de ganado ovino sano; también detectaron la variante *subAB*₂ en 24 de las 26 cepas ECVT O146:H21 y en 4 de las 7 cepas O146:H28 entre las 177 ECVT que aislaron de origen clínico humano. Del mismo modo, en un estudio llevado a cabo por Sánchez *et al.* (2013), entre los años 2009-2011 en el que analizaron 59 cepas ECVT aisladas de ciervo y jabalí, detectaron la variante *subAB*₂ en 2 cepas O146:H21 (1 aislada de heces de jabalí y otra aislada de heces de ciervo) y en 14 cepas O146:HNM (13 aisladas de heces de ciervo y 1 de canales de ciervo).

En cuanto a las secuencias tipo descritas en la colección de cepas ECVT O146 de este estudio, en la base de datos de Enterobase

<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>, la ST442 figura en más de 200 entradas, en su mayoría genomas y aparece asociada a diferentes serotipos, mayoritariamente O146:H21 de diferentes orígenes (humano, medio ambiente, animal), pero también al O91:H21, O103:H21, O156:H21 y O174:H21. En nuestra colección también determinamos la ST442 en las cepas O91:[H21] (ver apartados 4.4 y 4.6.2.1.). Por otro lado, la ST738 aparece identificada en muy pocas entradas (11 asociadas a genomas y 1 de la anterior *legacy database*), asociadas al serotipo O146:H28 y origen humano (en las 9 que figura el dato).

En la clasificación de Karmali (Karmali *et al.* 2003), al grupo de ECVT O146:H28 se le asignaría el seropatotipo C puesto que se ha descrito implicado en un caso de SUH pero nunca se le ha asociado con brotes (Stritt *et al.* 2013), mientras que al grupo de ECVT O146:H21 se le asignaría al seropatotipo D por aparecer vinculado a casos moderados de diarrea.

En resumen, nuestros resultados indicarían que el grupo clonal O146:[H21]-B1-ST442 tendría como reservorios importantes fauna silvestre, el ganado ovino, ganado caprino mientras que el grupo clonal O146:[H28]-F-ST738 aparecería claramente asociado a fauna silvestre, concretamente, cérvidos. A pesar de la heterogeneidad detectada en sus perfiles de macrorrestricción, tanto un grupo como otro tienen un perfil de virulencia característico. La alta prevalencia del O146:[H21]-B1-ST442 en nuestra área sanitaria, implicado en casos clínicos moderados (diarrea), tendría relación con su mantenimiento en diferentes reservorios (domésticos y silvestres). Hemos demostrado, además, la alta similitud de algunos de estos aislamientos animales con respecto a los de origen humano.



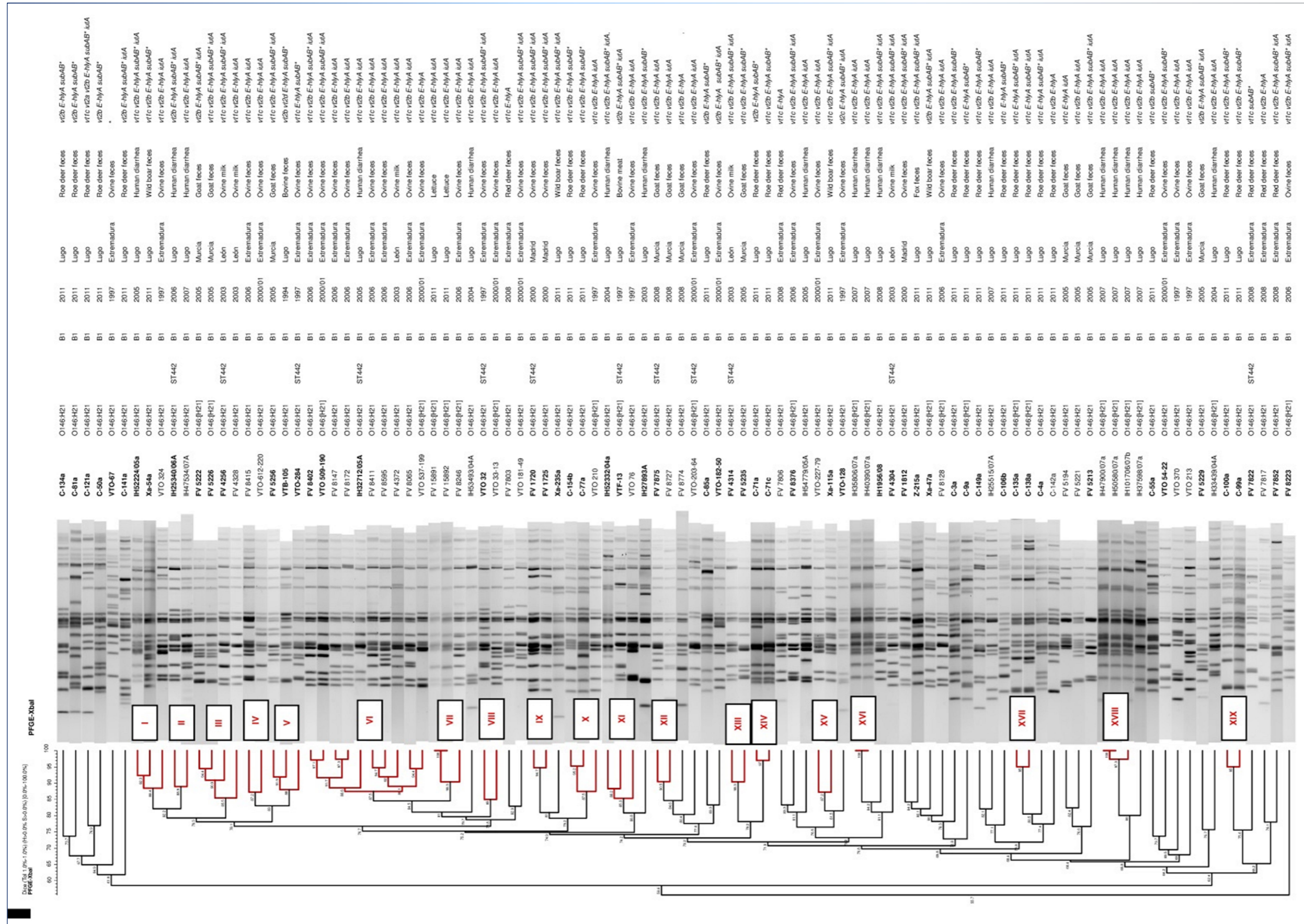


Figura 22. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 100 cepas ECVT O146:[H21]. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento. *VTO-67 originariamente v1c. Se indica en negra el código de las cepas analizadas para la variante cromosómica del gen subAB y los resultados positivos se indican como subAB*



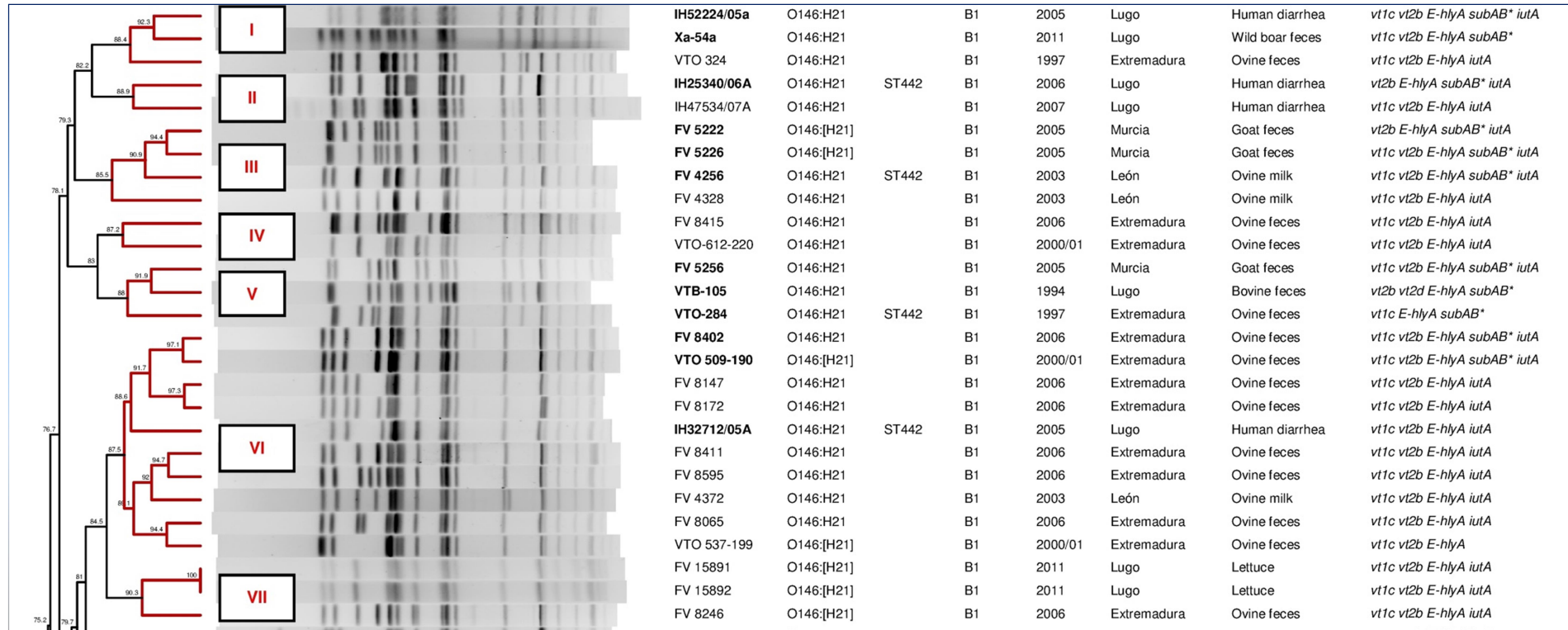


Figura 23. Detalle del dendrograma de la Figura 22 en el que se aprecian las cepas de los clústeres I-VII. Se indica en negrita el código de las cepas analizadas para la variante cromosómica del gen *subAB*, cuyos resultados positivos se muestran como *subAB**

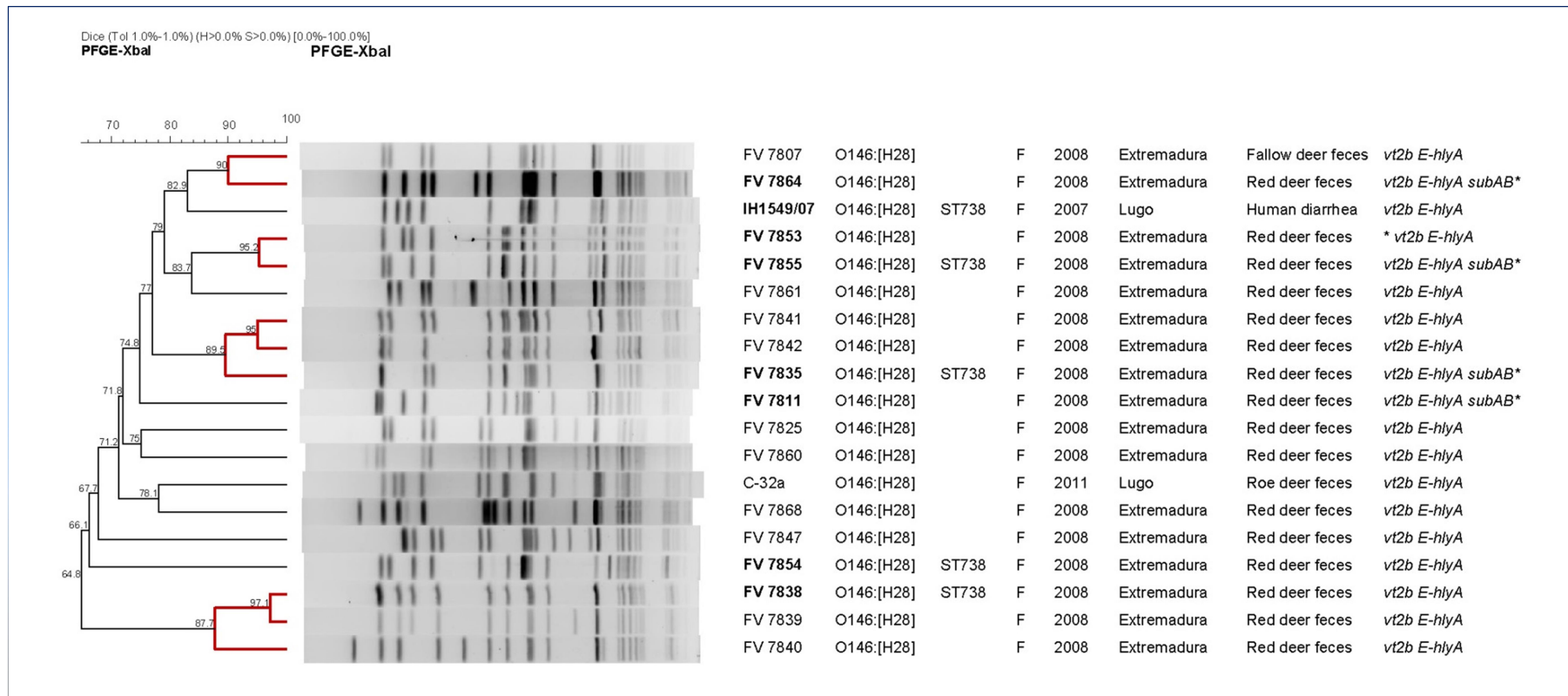


Figura 24. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 19 cepas ECVT O146:[H28]. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. *FV 7853 originariamente *vt1*. Se indica en negrita el código de las cepas analizadas para la variante cromosómica del gen *subAB*, cuyos resultados positivos se muestran como *subAB**

4.5.4. Otros grupos clonales

4.5.4.1. Grupos clonales O5:HNM-A-ST342, O5:HNM-A-ST1797 y O5:HNM-B1-ST447

Se analizaron 15 cepas de ECVT del serotipo O5:HNM, 3 de origen clínico humano, 4 de heces de ganado ovino, 6 de heces de ganado caprino, 1 de carne de vacuno y 1 aislada de las heces de un zorro (Tabla 19).

Dentro de este serotipo se definieron 3 grupos clonales en base a su filogrupo y ST (O5:HNM-A-ST342; O5:HNM-A-ST1797; O5:HNM-B1-ST447), que en el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 15 cepas O5:HNM (Figura 25) quedaron distribuidos respectivamente en Grupo A (78,6% de identidad), Grupo B (85,1% de identidad), y Grupo C (77,5% de identidad). Los Grupos A y C incluían clústeres con una similitud >85% que englobaban cepas de origen humano y animal.

El Grupo A incluye cepas aisladas entre los años 2003 y 2010 en la provincia de Lugo, de origen humano, cárnico y silvestre. Las 4 cepas del grupo clonal O5:HNM-A-ST342 eran *vt1a*, *eae-β1*, *E-hlyA*, *espP*; adicionalmente, las 2 cepas con mayor similitud (carne de bovino y origen humano, 94,7% de similitud) portaban el gen *vt2a*, y a su vez mostraron >89% de identidad con la cepa aislada de zorro. La ST342 aparece en Enterobase <http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/> fundamentalmente asociada a cepas O5 de origen humano, ganado y alimentos.

El Grupo B agrupa únicamente una cepa de origen caprino aislada en Murcia en 2003 y otra cepa de origen ovino aislada en Extremadura en 1997, mostrando >85% de similitud. Ambas cepas son portadoras de los genes *vt1c*, *vt2b*, y *subAB* (variante cromosómica); adicionalmente, la cepa ovina resultó portadora además del gen *E-hlyA*. La ST1797 asociada a este grupo clonal se describe por primera vez en este estudio.

El Grupo C incluye 9 cepas aisladas entre los años 1997 y 2007, en diferentes comunidades y con diversos orígenes (1 cepa de origen humano, 3 de origen ovino y 5 de origen caprino). Todas las cepas de este grupo eran portadoras de los genes *vt1c* y *E-hlyA*, 5 de ellas portan además el gen *vt2b* y 6 de ellas el gen *subAB* (variedad cromosómica). Destaca el clúster (similitud del 86,5%) de 5 cepas de distintos orígenes geográficos y temporales, incluida una de origen clínico humano. La ST447 aparece asociada en Enterobase a solo 11 genomas para los que el serotipo predicho es O5:H19.

Ninguna de las cepas ECVT O5 de nuestra colección resultó positiva para los genes *katP*, *espP*, *saa*, *stcE*, *iutA*, *subAB* (su variante plasmídica).

Bettelheim (2007) recogía en su publicación que los datos referidos a las cepas de ECVT del serotipo O5:HNM sugerían 2 patotipos diferenciados: uno de origen ovino, portador de los genes *vt1* y *vt2*, productor de enterohemolisina, *eae* negativo e implicado en casos de SUH (Starr *et al.* 1998); y otro de origen bovino, aislado tanto de terneros sanos como con diarrea, y que es portador de *vt1*, enterohemolisina positivo y portador del gen *eae-β1*. Las cepas de este segundo patotipo normalmente producen ureasa, a diferencia de las de origen ovino, y se han visto implicadas en diarrea sanguinolenta (McLean *et al.* 2005). Nosotros hemos determinado también estos 2 grupos clonales si bien, a diferencia de los resultados obtenidos por Bettelheim (2007), en el grupo de origen bovino (O5:HNM-A-ST342) detectamos cepas portadoras además de *vt2a*, subtipo asociado con patologías graves en seres humanos. Nosotros definimos este grupo además de en carne de bovino, en humanos con diarrea y en animales silvestres. Al igual que en estudios previos (Mercado *et al.* 2004; McLean *et al.* 2005), corroboramos que las 4 cepas del grupo clonal O5:HNM-A-ST342, portadoras del gen *eae-β1* eran productoras de ureasa, a diferencia de los otros 2 grupos clonales *eae* negativos (Tabla 35 y Figura 25). También determinamos el patotipo descrito por Bettelheim (2007) asociado a cepas de origen ovino, que en nuestro estudio se correspondería con el grupo clonal O5:HNM-B1-ST447. Este grupo clonal lo hemos definido en 3 cepas aisladas de heces de ganado ovino, 5 de heces de caprino y 1 cepa aislada de un paciente con diarrea. Todas las cepas que detectamos en este grupo clonal son *vt1c*, 5 de las 9 son adicionalmente *vt2b*, combinación frecuentemente detectada en cepas de ECVT aisladas de pequeños rumiantes (Martin y Beutin, 2011; Mora *et al.* 2012a). A diferencia del grupo clonal detectado por Bettelheim, las cepas de nuestro estudio no todas poseen el gen *vt2*; sin embargo, sí son todas *E-hlyA* positivas, *eae* negativas.

Además de los patotipos descritos por Bettelheim (2007), determinamos un tercer grupo clonal dentro del serotipo O5:HNM: el O5:HNM-A-ST1797. Este grupo lo formaron 2 cepas aisladas de caprino y ovino, respectivamente, y presentan la secuencia tipo ST1797 no descrita hasta este momento. Las 2 cepas son *vt1c* y *vt2b*, y *eae* negativas. Ninguna creció en MACSTC y fueron negativas para los genes de resistencia al telurito.

Globalmente, todas las cepas del serotipo O5:HNM de nuestro estudio resultaron fermentadoras de sorbitol y positivas para la β -glucuronidasa. Seis de las 15 cepas crecieron en MACSTC y resultaron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 35 y Tabla 27). Como se indicó arriba, las cepas del grupo clonal O5:HNM-A-ST342 fueron las únicas positivas para la ureasa.

Tabla 35. Presencia de genes de resistencia al telurito, crecimiento en MACSTC, producción de ureasa y fermentación del sorbitol y β -glucuronidasa de las cepas ECVT O5:HNM

Código cepa	^a Origen	<i>terD</i> / <i>terB</i>	Crecimiento MACSTC	^b Sorbitol	Ureasa	β -glucuronidasa
IH28275/06A	H	+	+	+	+	+
IH39114/07F	H	+	+	+	+	+
CP144-6-28	CV	+	+	+	+	+
Z-237	S (zorro)	+	+	+	+	+
FV5246	C	-	-	+	-	+
VTO-124	O	-	-	+	-	+
FV5241	C	-	-	+	-	+
VTO-35	O	-	-	+	-	+
FV5244	C	-	-	+	-	+
IH28962/07C	H	+	+	+	-	+
VTO-449	O	-	-	+	-	+
FV5247	C	-	-	+	-	+
FV5238	C	-	-	+	-	+
VTO-78	O	-	-	+	-	+
FV5249	C	+	+	+	-	+

^aOrigen de aislamiento de las cepas (H: heces de humano con diarrea, CV: carne de vacuno, O: heces de ovino, C: heces de caprino, S: heces de animal silvestre). ^bFermentación del sorbitol en medio MACS

En nuestro país, el serotipo O5:HNM fue uno de los más frecuentemente detectados por nuestro grupo entre las cepas de ECVT aisladas en casos clínicos humanos en Lugo entre los años 2003-2013 (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar). En cuanto a los reservorios, no hemos aislado en España cepas ECVT O5 en ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c), sin embargo, sí que las hemos aislado en el ganado ovino y caprino en distintos estudios (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Cortés *et al.* 2005; Sánchez *et al.* 2009b; Horcajo *et al.* 2010). En la fauna silvestre también detectamos el serotipo O5:HNM en la cepa de heces de zorro incluida en el presente estudio (Z-237) (Mora *et al.* 2012a). Solo hemos aislado cepas de ECVT O5:HNM en carne picada de ternera, y en baja proporción: solo 1 aislamiento ECVT O15:HNM (incluido en esta tesis, CP144-6-28) de 95 muestras positivas entre 785 de carne picada de vacuno, analizadas entre 1995-2003 (Mora *et al.* 2007a); y ningún aislamiento positivo entre 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

Entre las 15 cepas ECVT O5 de nuestra colección, 8 fueron positivas para la variante cromosómica de la subtilasa (*subAB*₂), concretamente las 2 cepas ST1797 y 6 cepas ST447.

Varios estudios (Orden *et al.* 2011; Michelacci *et al.* 2013; Sánchez *et al.* 2013; Nüesch-Inderbinen *et al.* 2015) han demostrado que *subAB₁* es la variante predominante entre las cepas ECVT subtipos positivas de origen bovino, mientras que *subAB₂* estaría diseminado entre las cepas ECVT aisladas de ganado ovino, caprino y rumiantes silvestres, lo que coincidiría con el origen de nuestras 8 cepas. Asimismo Orden *et al.* (2016) identificaron la variante *subAB₂* en las 9 cepas ECVT O5:HNM de origen caprino incluidas en su estudio.

El serotipo O5:HNM está asociado a SUH (Willshaw *et al.* 1992; Bielaszewska *et al.* 1996; Starr *et al.* 1998; Meng *et al.* 1998) aunque no a brotes, por lo que Karmali *et al.* (2003) lo asignaron al serotipo C (en concreto cepas O5:HNM *vt1 eae E-hlyA espP*). En nuestro caso, solo las hemos encontrado asociadas a diarrea en humanos.

En resumen, encontramos el serotipo O5:HNM asociado a humanos, a los pequeños rumiantes (ganado ovino y caprino), e incluso a animales silvestres (zorro) (Mora *et al.* 2007a; Mora *et al.* 2012a). Nuestros resultados corroboran los obtenidos en otros estudios, ya que el serotipo O5:HNM es uno de los frecuentemente detectados entre las cepas de ECVT aisladas de pacientes de nuestra área sanitaria (Mora *et al.* 2011; datos LREC no publicados) y es un serotipo con elevada prevalencia entre cepas de origen ovino (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003) y caprino (Orden *et al.* 2003; Cortés *et al.* 2005) en España. Puede concluirse que los ECVT O5:HNM son potencialmente patógenos para seres humanos, en especial los pertenecientes al grupo clonal O5:HNM-A-ST342; y que el ganado ovino, caprino, e incluso los animales silvestres actuarían como un importante reservorio de este tipo de cepas.

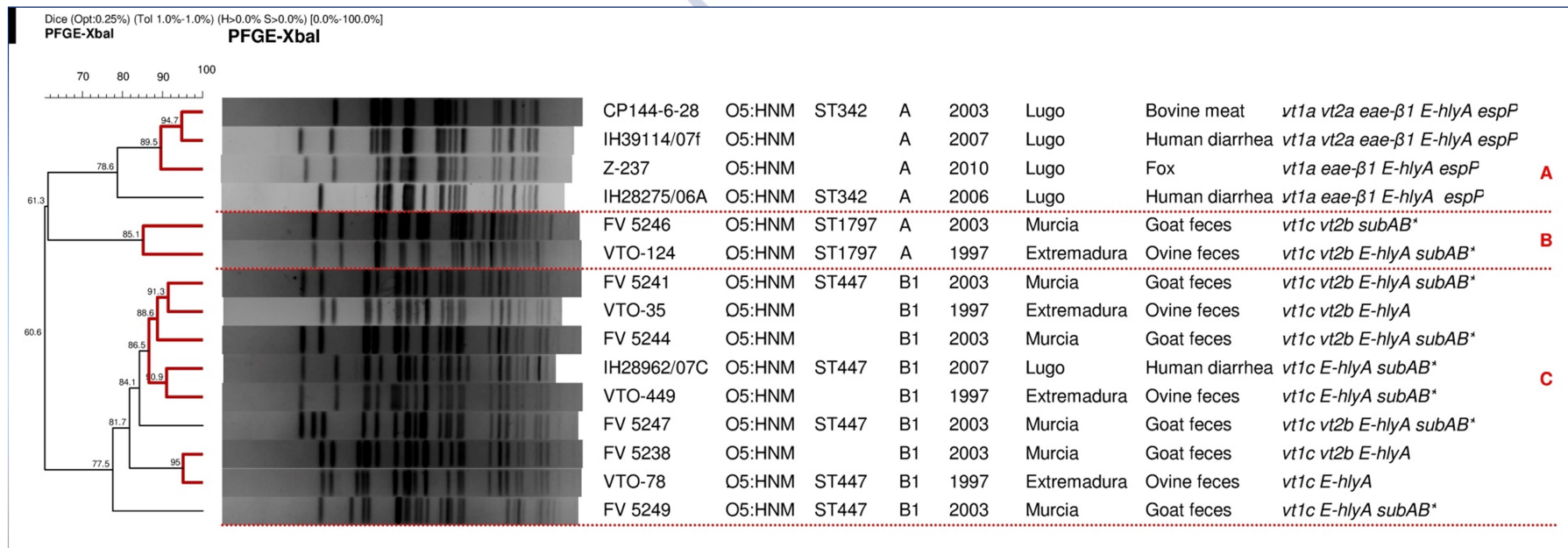


Figura 25. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 15 cepas de ECVT O5:HNM. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. Los resultados positivos a la variante cromosómica de la subtilasa se indican como *subAB**

4.5.4.2. Grupo clonal O8:H2-B1-ST1798/ST1834

Se analizaron 7 cepas de ECVT del serotipo O8:H2, todas ellas aisladas de heces de bovino, en Lugo, entre los años 1994 y 1995 (Tabla 19).

Dentro de este serotipo se definió un único grupo clonal en base a su filogrupo y ST, puesto que a pesar de presentar 2 ST diferentes (1798 y 1834), estos estarían incluidos dentro del mismo ST Cplx por presentar una única diferencia alélica en el gen *mdh* (Tabla 30). Ambas ST fueron descritas por primera vez vinculadas a las cepas de esta colección (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/>). Actualmente figura también un genoma de un aislamiento humano ST1798 en Enterobase.

Si bien las cepas de nuestra colección forman un grupo relativamente homogéneo en cuanto a origen de aislamiento y perfil de genes de virulencia, en el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 7 cepas O8:H2 (Figura 26) mostró una alta heterogeneidad (67,2% de similitud entre ellas) con un único clúster >85% de 3 cepas.

En cuanto a los genes asociados a la virulencia, las cepas O8:H2 se agruparon en 3 combinaciones diferentes: (1) *vt2d E-hlyA espP subAB* (variante plasmídica) *saa* (3 cepas); (2) *vt1a vt2d E-hlyA espP subAB* (plasmídica) *saa* (3 cepas); y (3) *vt1a vt2a vt2d* (1 cepa). Por lo tanto, todas las cepas poseían el gen *vt2d*, y 6 de ellas compartían 5 genes de virulencia: *vt2d E-hlyA espP subAB* (plasmídica) *saa*. En cualquier caso, todas las cepas de este serotipo eran portadoras de uno o varios de los subtipos de verotoxinas asociadas a los síntomas clínicos más graves en humanos (*vt1a*, *vt2a*, *vt2c* y *vt2d*) (Friedrich *et al.* 2003; Jelacic *et al.* 2003; Bielaszewska *et al.* 2013). Ninguna cepa O8:H2 resultó positiva para los genes *eae*, *katP*, *stcE*, *iutA*.

Seis de las 7 cepas de este serotipo eran portadoras del gen *saa* y la variante plasmídica de la subtilasa (*subAB₁*), la coexistencia de estos 2 genes en la misma cepa fue descrita originariamente por Paton y Paton (2005) en la cepa 98NK2, en la que el gen *subAB* estaba flanqueado en 3' por el gen que codifica para la adhesina autoaglutinante *saa*, aunque también observaron que la correlación no era del 100%. Asimismo, como se comenta en el apartado anterior, varios estudios han demostrado que *subAB₁* es la variante predominante entre las cepas ECVT subtilasa positivas de origen bovino, mientras que *subAB₂* estaría diseminado entre las cepas ECVT aisladas de ganado ovino, caprino y rumiantes silvestres, lo que coincidiría con el origen de nuestras cepas (Orden *et al.* 2011; Michelacci *et al.* 2013; Sánchez *et al.* 2013; Nüesch-Inderbinnen *et al.* 2015).

Según la revisión de Bettelheim (2007), se han detectado cepas ECVT del serogrupo O8 portadoras de los antígenos HNM, H2, H3, H4, H5, H8, H9, H10, H11, H14, H16, H20, H21, H25, H30, H31, H35, H51 y HNT. A pesar de que este serogrupo se ha aislado de diferentes

fuentes, solo se han visto involucrados en infecciones humanas los serotipos O8:HNM, O8:H2, O8:H9, O8:H10, O8:H14, O8:H19, O8:H21 y O8:HNT.

En España no detectamos el serotipo O8:H2 entre las cepas de ECVT aisladas en casos clínicos humanos en Lugo entre los años 2003-2013 (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar). En cuanto a los reservorios, hemos aislado cepas ECVT O8:H2 del ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c) (cepas incluidas en esta colección), pero no del ganado ovino o caprino en diferentes estudios (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Horcajo *et al.* 2010), aunque sí aislamos en ganado ovino ECVT de los serotipos O8:H8, O8:H9, O8:H19 y O8:H21 (Blanco *et al.* 2003b; Rey *et al.* 2003). En la fauna silvestre no detectamos el serotipo O8:H2, pero sí detectamos el O8:H10 en heces de corzo (Mora *et al.* 2012a). En cepas de carne picada de ternera no determinamos el serotipo O8:H2 aunque sí los serotipos O8:H21 y O8:HNM entre 785 de carne picada de vacuno, analizadas entre 1995-2003 (Mora *et al.* 2007a); y detectamos los serotipos O8:H9 y O8:H19 en carne picada de cerdo, y el serotipo O8:H30 en productos lácteos entre 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

Globalmente, todas las cepas del serotipo O8:H2 de nuestro estudio resultaron ser fermentadoras de sorbitol y positivas para la β -glucuronidasa. Ninguna creció en MACSTC ni resultó positiva para los genes *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27).

Aunque nosotros no hemos detectado cepas ECVT O8:H2 en humanos, este serotipo se ha asociado a casos de SUH en humanos en Alemania y España (Friedrich *et al.* 2002; Blanco *et al.* 2003), por lo que según la clasificación de Karmali *et al.* (2003) se le asigna el seropatotipo C. En estos mismos países, el serotipo O8:H2 se ha identificado en cepas de ECVT aisladas de ganado vacuno sano (Beutin *et al.* 1993; Blanco *et al.* 2003), lo que concuerda con los datos del presente estudio.

En conclusión, el grupo clonal O8:H2-B1-ST1798/ST1834 parece estar asociado al ganado vacuno sano, presenta baja prevalencia y, por su perfil de genes de virulencia, sería potencialmente patógeno para seres humanos. Es importante destacar que en este estudio se describen por primera vez las ST asociadas a este serotipo de ECVT.

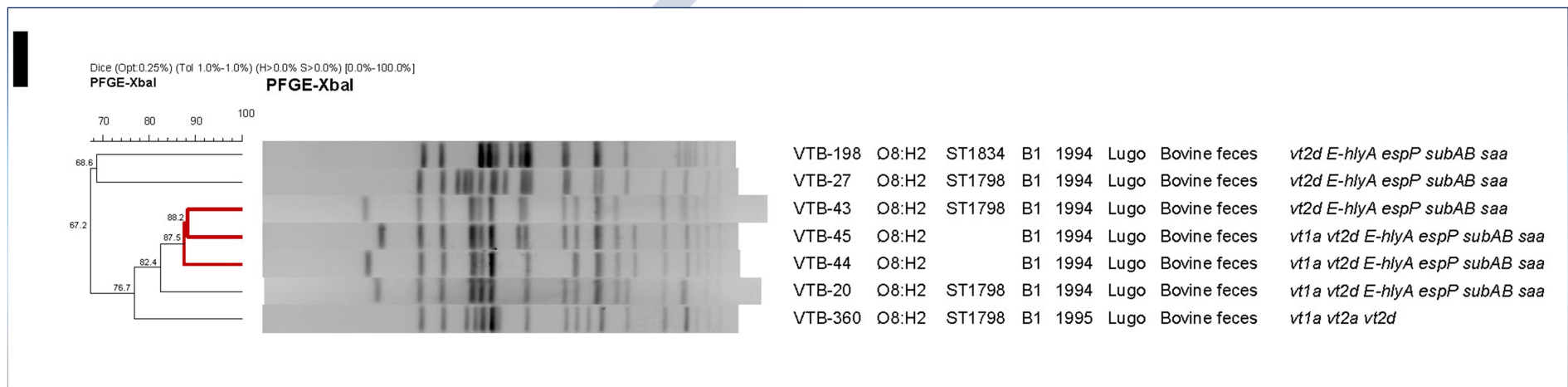


Figura 26. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 7 cepas de ECVT O8:H2. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia

4.5.4.3. Grupos clonales O20:H19-B1-ST192 y O20:H19-B1-ST205/ST443

En el presente estudio se incluyeron 10 cepas de ECVT del serotipo O20:H19 aisladas en Lugo entre los años 1994 y 1995 (Tabla 19): 1 cepa de origen clínico humano y 9 aisladas de heces de ganado bovino.

Dentro de este serotipo se definieron 2 grupos clonales en base a su filogrupo y ST (O20:H19-B1-ST192 y O20:H19-B1-ST205/ST443), que en el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 10 cepas O20:H19 (Figura 27) quedaron distribuidos respectivamente en Grupo A (72,6% de identidad) y Grupo B (76,8% de identidad). Solo el Grupo B incluía un pequeño clúster con similitud >85% que englobaba 4 cepas de origen bovino. La única cepa de origen humano de la colección O20:H19 pertenecía a la ST443 y presentó una identidad del 79,8% con las cepas bovinas.

Por tanto, el Grupo A (O20:H19-B1-ST192) incluye únicamente cepas de origen bovino aisladas en Lugo en el mismo periodo, que a pesar de ser muy homogéneas en su perfil de virulencia (las 3 cepas eran *vt2c* y 2 de ellas eran además *vt2d*), presentaron una similitud de solo el 72,6% en sus perfiles de macrorrestricción.

El Grupo B, agrupa 6 cepas de origen bovino y 1 cepa de origen clínico humano, todas aisladas en Lugo entre los años 1994 y 1998. Las 7 cepas las definimos como un único grupo clonal, O20:H19-B1-ST205/ST443, puesto que las 2 ST determinadas (205 y 443) pertenecen al mismo ST205 Cplx según figura en la base MLST, y presentan una única diferencia alélica en el gen *fumC* (Tabla 30). Todas las cepas de este grupo clonal, salvo una (*vt1* negativa), presentaron los genes *vt1a*, *vt2a*, *E-hlyA* y *espP*. Curiosamente, a pesar de que 5 cepas fueron positivas para el gen *saa*, solo 1 de ellas resultó positiva para la variante plasmídica de la subtilasa, junto con otra cepa *saa* negativa. Como ya se comentó en el apartado anterior (4.5.4.2. Grupo clonal O8:H2-B1-ST1798/ST1834) la variante plasmídica *subAB_I*, generalmente va colocada con el gen *saa*, aunque esta correlación se ha observado que no se da en todos los casos (Paton y Paton, 2005).

Ninguna cepa O20:H19 resultó positiva para los genes *eae*, *katP*, *stcE*, *iutA* ni para la variante cromosómica de la subtilasa.

En nuestro país, únicamente hemos aislado una cepa de ECVT O20:H19 (incluida en esta colección) de 126 cepas ECVT de origen humano del estudio realizado entre 1992 y 1999 en el HULA (Blanco *et al.* 2004), y no detectamos este serotipo entre las cepas de ECVT aisladas en casos clínicos humanos en Lugo entre los años 2003-2013 (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar). En cuanto a los reservorios, hemos aislado en España cepas ECVT O20:H19 y O20:H7 en ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c), sin embargo, no hemos aislado cepas de ECVT O20:H19 en el ganado ovino ni en el ganado caprino ni en fauna silvestre en distintos

estudios (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003, 2008; Rey *et al.* 2003; Sánchez *et al.* 2009b; Horcajo *et al.* 2010; Mora *et al.* 2012a); aunque sí aislamos en ganado ovino ECVT del serotipo O20:H7 (Rey *et al.* 2003). En carne picada de ternera no detectamos el serotipo O20:H19 entre las 95 muestras positivas para ECVT de 785 de carne picada de vacuno analizadas entre 1995-2003 (Mora *et al.* 2007a); y tampoco detectamos ECVT O20 entre 1.253 muestras analizadas entre los años 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

En la literatura científica, el origen de las cepas ECVT O20:H19 está relacionado con el ganado vacuno sano (Beutin *et al.* 1993; Parma *et al.* 2000; Blanco *et al.* 2004c) o con alimentos de origen vacuno (Parma *et al.* 2000). Blanco *et al.* (2004) describieron por primera vez un aislamiento de este serotipo en una cepa de ECVT de origen clínico humano, implicado en diarrea, por lo que según la clasificación de Karmali *et al.* (2003) se le asignaría el seropatótipo D. La baja frecuencia de este serotipo para cepas ECVT según la literatura científica se correlaciona con los datos recogidos en Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>): aunque encontramos 13 referencias para ST192, 70 para ST205 y 220 para ST443 (a fecha de diciembre de 2017), todas ellas pertenecen, según la predicción *in silico*, a diferentes serotipos, pero en ninguna se identifica el O20.

Fenotípicamente todas las cepas O20:H19 resultaron ser fermentadoras de sorbitol y positivas para la β -glucuronidasa. Tres de las 10 cepas crecieron en MACSTC, de las que solo una resultó positiva para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27).

En conclusión, hemos encontrado una asociación de los grupos clonales ECVT O20:H19-B1-ST192 y O20:H19-B1-ST205/ST443 con el origen bovino, y aunque parece presentar muy baja prevalencia, al menos el O20:H19-B1-ST205/ST443 sería potencialmente patógeno para los seres humanos en base a los subtipos de verotoxinas (*vt1a*, *vt2a*) y los otros genes de virulencia característicos de su perfil (*E-hlyA*, y en menor medida *subAB₁*).

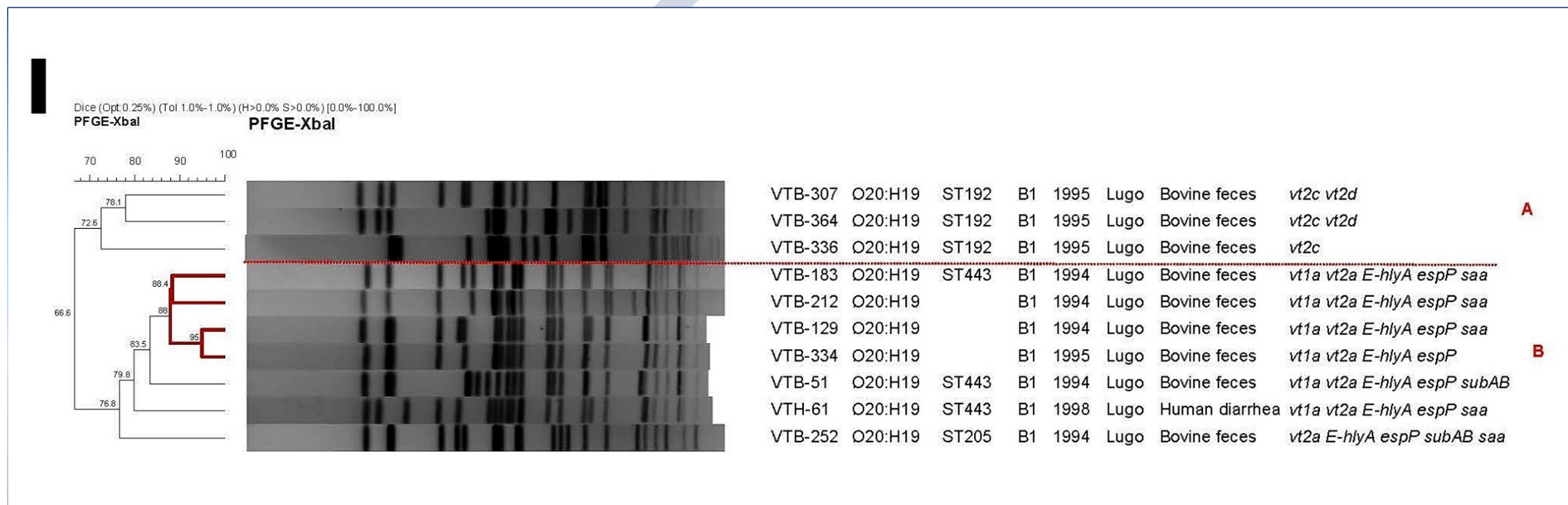


Figura 27. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 10 cepas de ECVT O20:H19. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupa, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia

4.5.4.4. Grupo clonal O75:[H8]-B1-ST13

En el presente estudio se incluyeron 3 cepas de ECVT del serotipo O75:[H8], 1 de origen clínico humano y 2 aisladas de las heces de un corzo y jabalí, respectivamente (Tabla 19).

Dentro de este serotipo se definió 1 grupo clonal en base a su filogrupa y ST (O75:[H8]-B1-ST13), y el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 3 cepas O75:[H8] (Figura 28) mostró únicamente un 66,5% de similitud entre ellas a pesar de que presentaban la misma combinación de genes de virulencia: *vt1c*, *vt2b*, *E-hlyA*, *subAB* (variante cromosómica). Las cepas aisladas de corzo y jabalí fueron además *iutA* positivas. Ninguna de las cepas de este serotipo resultó positiva para los genes *eae*, *katP*, *espP*, *stcE*, *saa*, ni para la variante plasmídica de la subtilasa.

Fenotípicamente, las 3 cepas del serotipo O75:[H8] de nuestro estudio crecieron en MACSTC y fueron positivas para la β -glucuronidasa; además, resultaron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito. Curiosamente la cepa de origen humano y el aislamiento de jabalí eran sorbitol negativas, mientras que el aislamiento de corzo era fermentador del sorbitol (Tabla 27).

Nosotros únicamente hemos aislado una cepa de ECVT O75:H8 de origen humano (incluida en el presente estudio), tanto entre las 126 cepas ECVT del estudio realizado entre 1992 y 1999 en el HULA (Blanco *et al.* 2004), como entre la colección de cepas ECVT aisladas en casos clínicos humanos en este mismo hospital entre los años 2003-2013 (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar). En cuanto a los reservorios, no hemos aislado en España cepas ECVT O75 en ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c), sin embargo sí que hemos aislado cepas del serotipo O75:H8 en ganado ovino (Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003); así como de los serotipos O75:H55 y O75:HNM (Blanco *et al.* 2003b; Rey *et al.* 2003). En la fauna silvestre detectamos el serotipo O75:H8 en las cepas incluidas en este estudio, obtenidas de heces de corzo y de jabalí (Mora *et al.* 2012a). En alimentos, solo hemos aislado cepas de ECVT O75:H8 en carne picada de ternera, y en baja proporción: 2 aislamientos ECVT O75:H8 de 95 muestras positivas, entre 785 de carne picada de vacuno analizadas entre 1995-2003 (Mora *et al.* 2007a); y no lo detectamos entre 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015). Por tanto, según nuestros datos, estaríamos ante un grupo clonal de baja prevalencia y, aparentemente asociado a animales silvestres. De hecho, encontramos en España el trabajo de Sánchez *et al.* (2013) que aislaron una cepa ECVT O75:H8 de heces de un cérvido. Similar a nuestros aislamientos, la cepa era *vt2b*, *Ehly-A* y *subAB*₂. Al igual que estos autores, encontramos que podría haber una asociación entre subtipo *vt2b* y *subAB*₂, y que la fauna silvestre podría ser un reservorio de *subAB*₂. En este sentido, también Funk *et al.* (2013) aislaron una cepa ECVT O75:H8 *subAB*₂ de carne de ciervo.

En otros países como Australia, Nueva Zelanda, Brasil y Méjico, este serotipo se ha asociado a aislamientos de ECVT en ganado ovino (Brett *et al.* 2003; Vettorato *et al.* 2003; Djordjevic *et al.* 2004; Cookson *et al.* 2006a; Amézquita-López *et al.* 2012), y en Méjico, además, Amézquita-López *et al.* (2014) lo detectaron en aislamientos de origen bovino. La relativa baja frecuencia de este serotipo para cepas ECVT según la literatura científica se correlaciona con los datos recogidos en Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>): encontramos 48 referencias para ST13 (a fecha de diciembre de 2017), y solo 2 asociadas a O75:H8 según la predicción *in silico*.

A las cepas ECVT O75:H8 se les ha asignado el seropatotipo D de la clasificación de Karmali *et al.* (2003), ya que no está asociado ni a brotes ni a enfermedades graves. Es importante señalar que su presencia en fauna silvestre señalaría a estos animales como reservorios y potenciales transmisores de este tipo de cepas al hombre.



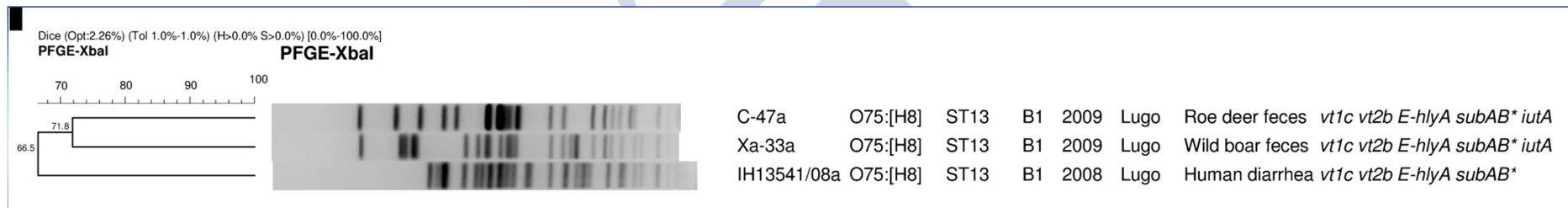


Figura 28. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 3 cepas de ECVT O75:[H8]. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. Los resultados positivos a la variante cromosómica de la subtipa se indican como *subAB**

4.5.4.5. Grupo clonal O76:H19-B1-ST675

Se analizaron 30 cepas de ECVT del serotipo O76:H19, 5 de origen clínico humano, 7 de heces de ganado ovino, 17 de heces de ganado caprino y 1 aislada de las heces de un jabalí. Las cepas fueron aisladas en distintas áreas geográficas españolas entre los años 1998 y 2009, si bien todos los aislamientos de origen humano procedían del hospital de nuestra ciudad (Tabla 19).

Dentro de este serotipo quedó definido un único grupo clonal en base a su serotipo, filogrupo y ST (O76:H19-B1-ST675). El dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 30 cepas O76:H19 (Figura 29) mostró una elevada homología entre todas las cepas (78,7% de similitud), a pesar de los distintos orígenes y las diferentes procedencias geográficas (Murcia, Extremadura y Lugo); de hecho, 23 de las 30 cepas formaron un clúster de similitud >85% (Clúster A) con cepas de origen humano y animal (ovino, caprino y jabalí). Cabe destacar dentro de este Clúster A, los perfiles de macrorrestricción prácticamente idénticos (97,8% de similitud) de una cepa aislada en Murcia en 2004 de heces de ganado caprino (FV5202) y otra aislada en Lugo en 1998 de un paciente con diarrea (VTH-80). Las 30 cepas O76:H19 presentaron, además, el mismo perfil de genes de virulencia: *vt1c*, *E-hlyA* y *subAB* (la variante cromosómica).

Fenotípicamente, todas las cepas O76:H19 de nuestro estudio resultaron fermentadoras de sorbitol, al igual que las descritas por Stephan y Untermann (1999), y positivas para la β -glucuronidasa. Solamente 2 de las 30 crecieron en MACSTC y todas resultaron negativas para *terB/D* (Tabla 27).

El serotipo O76:H19 es uno de los más frecuentemente detectados en cepas de ECVT aisladas en ovejas, cabras (Rey *et al.* 2003) y en cabritos sanos (Orden *et al.* 2008). Se ha detectado en cepas ECVT aisladas de productos cárnicos en Casablanca (Marruecos) (Badri *et al.* 2011), de canales de corderos en EE.UU. (Kalchayanand *et al.* 2007) y de leche de oveja y cabra en España (Rey *et al.* 2006). Más recientemente, Oden *et al.* (2016) analizaron 30 cepas O76:H19 de origen caprino y, al igual que las de este estudio, resultaron positivas para *vt1c* y *subAB*₂ (*subAB*_{2,1} y *subAB*_{2,2}). También se ha identificado este serotipo en cepas aisladas de humanos con diarrea y de portadores asintomáticos (Blanco *et al.* 2004; Sánchez *et al.* 2014). En 2004, Beutin *et al.* en Alemania, describieron 2 perfiles de virulencia en cuanto a sus subtipos *vt*: cepas *vt1c* y *vt1c vt2c*, respectivamente. En un trabajo publicado posteriormente, Islam *et al.* (2007) también aislaron cepas O76:H19 *vt1 vt2* en pacientes hospitalizados con diarrea en Bangladesh. Más recientemente, Fierz *et al.* (2017), describen una cepa ECVT O76:[H19] ST675 entre las 95 cepas clínicas aisladas en pacientes de Suiza entre 2010-2014, portadora de *vt1c*, *vt2b*, *E-hlyA* y *subAB*₂ (*subAB*_{2,1} y *subAB*_{2,2}). Nosotros, sin embargo, solamente hemos detectado cepas positivas para *vt1c*, subtipo asociado principalmente a procesos diarreicos.

Los datos recogidos en Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>) (a fecha de diciembre de 2017), indican 86 entradas para la ST675 correspondientes a genomas de distintos orígenes (fundamentalmente clínico humano, pero también alimentos y animales de producción) cuya predicción *in silico* identifica O76:H19.

A este serotipo se le ha asignado el seropatotipo D de la clasificación de Karmali *et al.* (2003) ya que no está asociado ni a brotes, ni a enfermedades graves. En base a nuestros resultados, este grupo clonal tendría como reservorio principal a los pequeños rumiantes (ganado ovino y caprino), pero describimos por primera vez además su presencia en fauna silvestre (jabalí). También demostramos la alta similitud en los perfiles de macrorrestricción y virulencia entre las cepas ECVT O76:H19 de origen clínico humano y animal en España.



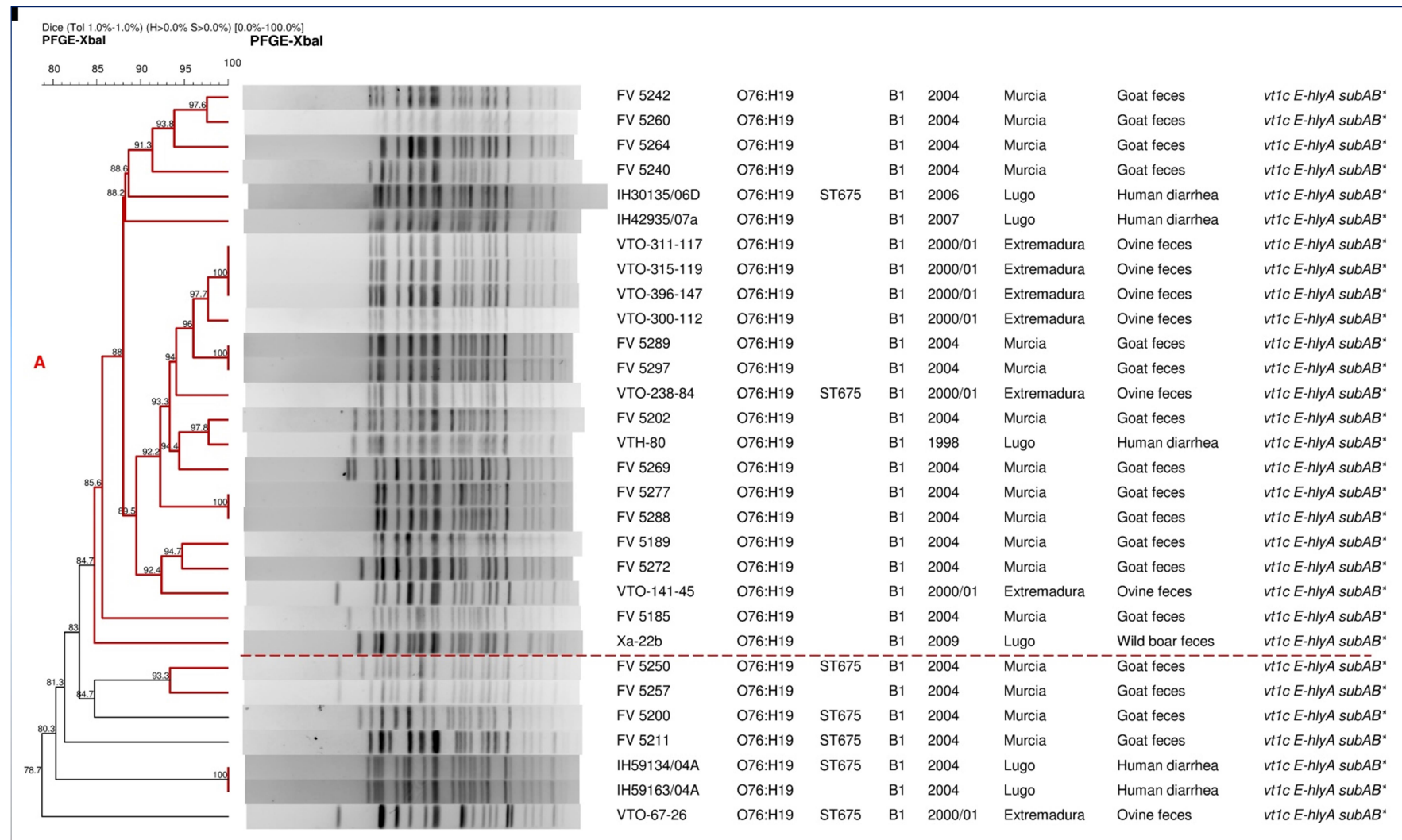


Figura 29. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 30 cepas ECVT O76:H19. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. Los resultados positivos a la variante cromosómica de la subtilasa se indican como *subAB**

4.5.4.6. Grupo clonal O77:H41-E-ST720

En el presente estudio se analizaron 12 cepas de ECVT del serotipo O77:H41, 2 de origen clínico humano, 8 aisladas de heces de ganado bovino y 2 de carne de vacuno. Todas ellas fueron aisladas en Lugo entre los años 1994 y 1998 (Tabla 19).

Dentro de este serotipo se definió un único grupo clonal en base a su filogrupo y ST (O77:H41-E-ST720), que en el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 12 cepas O77:H41 (Figura 30) mostró una heterogeneidad del 73,8% entre ellas, con únicamente 2 cluster (similitud >85%) que incluían cepas de origen bovino. Cada una de las 2 cepas de origen clínico humano se agrupó con un aislamiento de heces de bovino (82,1%) y de carne de vacuno (84,2%), respectivamente.

En cuanto a los genes asociados a la virulencia, las cepas O77:H41 se agruparon en 5 combinaciones diferentes: (1) *vt2a* (1 cepa); (2) *vt2d* (2 cepas); (3) *vt1a vt2d* (2 cepas); (4) *vt2d E-hlyA espP subAB* (variante plasmídica) *saa* (6 cepas); (5) *vt1a vt2d E-hlyA espP subAB* (variante plasmídica) *saa* (1 cepa). Por lo tanto, 3 cepas fueron *vt1* (del subtipo *vt1a*) y 12 fueron *vt2* (1 del subtipo *vt2a* y 10 *vt2d*; 1 cepa había perdido el gen, por lo que no pudo subtiparse). Todas las cepas de este serotipo eran portadoras de uno o varios de los subtipos de verotoxinas asociadas a los síntomas clínicos más graves en humanos (*vt1a*, *vt2a* y *vt2d*) (Friedrich *et al.* 2003; Jelacic *et al.* 2003; Bielaszewska *et al.* 2013). Siete de las 12 cepas fueron positivas para los genes *E-hlyA*, *espP*, *subAB* (variante plasmídica) y *saa* y ninguna cepa O77:H41 resultó positiva para los genes *eae*, *katP*, *stcE*, *iutA* o la variante cromosómica de la subtilasa.

Las 12 cepas de ECVT del serotipo O77:H41 resultaron ser fermentadoras de sorbitol y positivas para la β -glucuronidasa. Cuatro de las 12 cepas crecieron en MACSTC, de las que 3 resultaron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27).

En la literatura científica las únicas cepas aisladas del serotipo O77:H41 son las aisladas por nuestro grupo en terneros, en humanos y en carne de ternera picada (Blanco *et al.* 2003; Blanco *et al.* 2004c; Blanco *et al.* 2004; Mora *et al.* 2007a). Los datos recogidos en Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>) (a fecha de diciembre de 2017), indican 27 entradas para la ST720 correspondientes a genomas de distintos orígenes (fundamentalmente clínico humano, pero también medio ambiente y animales de producción) cuya predicción *in silico* identifica O17/O44/O77:H41.

Este grupo clonal, representado en la Figura 30, se le ha asignado el seroprototipo D de la clasificación de Karmali *et al.* (2003), ya que no está asociado ni a brotes ni a enfermedades graves. En nuestra área geográfica parece estar asociado al ganado vacuno sano, y por su perfil de genes de virulencia sería potencialmente patógeno para los seres humanos, aunque presenta baja prevalencia.

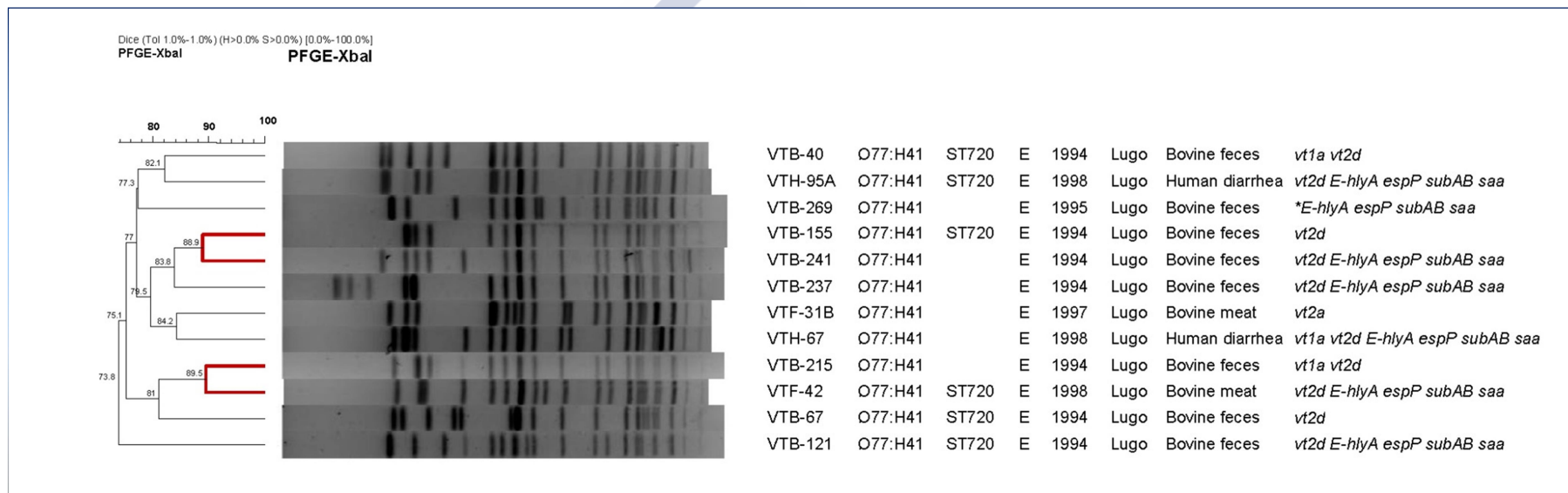


Figura 30. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 12 cepas ECVT O77:H41. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. *Cepa originariamente vt2 positiva

4.5.4.7. Grupos clonales O91:[H14]/HNM-B1-ST33 y O91:[H21]-B1-ST442

En el presente estudio se incluyeron 33 cepas de ECVT del serogrupo O91 que mediante serotipado y tipificación molecular mostraron 3 serotipos (O91:[H14], O91:HNM y O91:[H21]). Veintiuna de las 33 cepas O91 procedían de heces de ganado ovino, 6 de heces de ganado bovino, 5 de origen clínico humano y 1 de carne de vacuno (Tabla 19).

Dentro de este serogrupo se definieron 2 grupos clonales en base a su serotipo, filogrupo y ST (O91:[H14]/HNM-B1-ST33; O91:[H21]-B1-ST442), que en el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción (Figura 31) quedaron distribuidos en 3 Grupos (A, B, C) con tan solo un 54,1% de similitud global entre las 33 cepas.

Concretamente, las 26 cepas del grupo clonal O91:[H14]/HNM-B1-ST33 mostraron una alta diversidad, quedando distribuidas en el dendrograma en 2 agrupaciones de identidad <55%: Grupo A (24 cepas; 65% de identidad) y Grupo C (2 cepas; 86,5% de identidad). El Grupo A incluye 24 cepas aisladas entre los años 1997 y 2003, de diferente origen geográfico (Extremadura, Madrid y Galicia), y de diferente origen de aislamiento (heces de ovino, carne de vacuno, clínico humano); con 3 pequeños clústeres de identidad $\geq 85\%$, destacando el que incluye 1 cepa aislada en el año 2003 de carne de vacuno en Lugo (CP24-5A-03) y 1 cepa clínica humana aislada en el año 2004 en Lugo (IH44249/04A). Mediante secuenciación de 2 de las cepas del Grupo A (VTO-28 y VTO-91) se resolvió el antígeno H, identificándose el gen *fliC_{H14}* que codifica para el antígeno H14. El Grupo C incluye 2 cepas aisladas de pacientes con diarrea en Pontevedra y Lugo, en 1996 y 1997, respectivamente, que forman un clúster de similitud >85%. Es interesante destacar que la tipificación del antígeno H mediante secuenciación de estas 2 cepas, señala un posible nuevo antígeno, diferente del *fliC_{H14}* identificado en las cepas del Grupo A (por lo que serían en realidad cepas O91:HNT), lo que podría explicar la distribución de este grupo clonal en el dendrograma en diferentes grupos (A y C).

El grupo clonal O91:[H14]/HNM-B1-ST33 mostró también heterogeneidad en su perfil de genes de virulencia, si bien la mayoría de las cepas eran portadoras del subtipo *vt1a* (20 de 26 cepas) y/o del subtipo *vt2b* (22 de 26 cepas), ambos subtipos asociados con síntomas clínicos en seres humanos (Friedrich *et al.* 2003; Jelacic *et al.* 2003; Bielaszewska *et al.* 2013). Asimismo, la mayoría de las cepas eran portadoras de los genes *subAB* (variante cromosómica) e *iutA* (23 de 26 cepas); adicionalmente, 1 cepa era *vt1c*, 2 cepas *vt2a*, 7 cepas eran *E-hlyA*, y 3 cepas *katP* positivas (Figura 31).

El Grupo B del dendrograma incluye las 7 cepas del grupo clonal O91:[H21]-B1-ST442 (6 cepas de origen bovino y 1 de origen clínico humano), todas aisladas en Lugo entre los años 1994 y 1995, con 2 clústeres de identidad >85% que agrupan cepas de origen bovino. Este grupo clonal también mostró heterogeneidad en su perfil de genes de virulencia, aunque la

mayoría de las cepas eran portadoras del subtipo *vt2a* (5 de 7 cepas) y del gen *E-hlyA* (6 de 7 cepas); adicionalmente se detectaron otros genes: *saa* (4 cepas), *vt2d* (2 cepas), *vt1a* (2 cepas), *vt2c* (1 cepa) e *iutA* (1 cepa) (Figura 31).

Fenotípicamente, todas las cepas del serogrupo O91 resultaron ser fermentadoras de sorbitol y positivas para la β -glucuronidasa. Dos de las 33 cepas crecieron en MACSTC (1 cepa O91:H21 y 1 cepa O91:HNM), pero ninguna resultó positiva para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27). En el estudio realizado por Bielaszewska *et al.* (2009) sobre cepas ECVT O91 de origen clínico humano, ninguna de las 77 cepas O91:H14/HNT/HNM, y solo 1 de 20 cepas O91:H21 resultó positiva para el *ter* (en concreto para todos los genes *terZABCDEF*).

Los ECVT del serogrupo O91 constituyen uno de los subgrupos que carecen de la isla de patogenicidad LEE, pero que están asociados con procesos clínicos graves en humanos, incluido el SUH (Ito *et al.* 1990; Bonnet *et al.* 1998; Beutin *et al.* 2004; Bielaszewska *et al.* 2006 y 2009; Pradel *et al.* 2008; Mellmann *et al.* 2009; Feng y Reddy 2013; Dormanesh *et al.* 2015). De hecho, este grupo está considerado como ECEH atípicos (Madic *et al.* 2009). En nuestro país, el ECVT O91:H21/HNM fue uno de los ECVT más frecuentemente detectados en cepas de origen humano aisladas en un estudio realizado entre 1992 y 1999 en el hospital de Lugo (Blanco *et al.* 2004); sin embargo, en otro estudio realizado en este mismo hospital entre los años 2003-2013 únicamente aislamos 2 ECVT O91:HNM en casos clínicos humanos entre las 391 cepas ECVT aisladas de 13.691 muestras analizadas (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar); las cepas de ambos estudios están incluidas en la colección de esta tesis doctoral.

Bielaszewska *et al.* (2009) realizaron un estudio sobre 100 cepas de ECVT O91 aisladas de pacientes con diferentes cuadros clínicos (desde SUH, diarrea sanguinolenta, diarrea no sanguinolenta, dolor abdominal, sin diarrea y portadores asintomáticos) en Alemania, Austria, Finlandia, y Canadá, entre los años 1997 y 2007. Entre las 100 cepas O91 determinaron los antígenos H8, H10, H14, H21, HNT y HNM. Encontraron, además, que todas las cepas HNM y HNT portaban el gen *fliC* que codificaba para la flagelina del antígeno H14 (*fliC_{H14}*). En nuestra colección O91 hemos determinado los serotipos O91:[H21] (asociado a la ST442) y O91:[H14] (asociado a la ST33); además, hemos detectado dentro de las cepas HNM del grupo clonal ST33 un posible nuevo antígeno H diferente del H14 (serían HNT). No hemos detectado cepas ECVT O91 portadoras de los antígenos H8, ni H10. Al igual que Bielaszewska *et al.* (2009), encontramos una elevada prevalencia del gen *E-hlyA* entre las cepas ECVT O91. Sobre la misma colección de 100 cepas O91, pero en otro estudio, Mellmann *et al.* (2009) determinaron 10 ST distintos agrupados en 4 complejos clonales, con predominancia de ST33 y ST442. Estos autores encontraron una asociación significativa entre las cepas ST442 del serotipo O91:H21, con SUH o con diarrea sanguinolenta sin SUH. Otros autores corroboran esta asociación (Bonnet *et al.* 1998; Pradel *et al.* 2001), aunque también se han aislado cepas del serotipo O91:H21 de pacientes con cuadros moderados de diarrea en Alemania (Beutin *et al.* 2004). Por su parte, también en Alemania, Merkel *et al.* (2010)

determinaron el grupo clonal O91:H14/HNM-ST33 en cepas de pacientes con diarrea y/o SUH, de pacientes asintomáticos, y de muestras ambientales. Las cepas O91 de origen humano de nuestro estudio, tanto ST33 como ST442, estaban asociados a cuadros de diarrea.

En cuanto a los reservorios y vehículos de transmisión, se aprecia una gran variabilidad en la prevalencia y distribución geográfica. En concreto, el serotipo O91:HNM/[H14] nosotros lo hemos detectado asociado a ganado ovino (Blanco M *et al.* 2003b; Rey *et al.* 2003), sin embargo, otros autores identificaron cepas de este serotipo, además de en ovino, en ganado porcino (Beutin *et al.* 1993), y caprino (Bai *et al.* 2016). En el caso del serotipo O91:H21, nosotros lo hemos identificado únicamente en cepas aisladas de ganado bovino; sin embargo, en Alemania se han aislado cepas de ECVT O91:H21, además de en ganado bovino, en animales silvestres (corzo, ciervo y jabalí) (Miko *et al.* 2009). También el serogrupo O91 se describe frecuentemente en la rutina de muestras de alimentos en algunos países (Werber *et al.* 2008a), aunque en España la prevalencia de cepas de ECVT O91 parece ser baja. En un estudio realizado por nuestro grupo en carne picada de las carnicerías de Lugo entre los años 1995 y 2003, únicamente se aisló 1 cepa O91:HNM (incluida en este estudio) de 95 muestras ECVT positivas entre 785 muestras analizadas (Mora *et al.* 2007a), y en otro estudio realizado entre los años 2009 y 2012, solamente aislamos una cepa ECVT O91 portadora del antígeno H21 en carne picada de vacuno de las 1.253 muestras analizadas, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015). Sin embargo en Alemania, aislaron cepas ECVT O91:H14 de carne de vacuno, carne de cerdo, leche y derivados de ovino/caprino, carne de ciervo y carne de liebre; y cepas ECVT O91:H21 de leche y carne de vacuno, carne de cerdo, carne de jabalí y carne de ciervo (Martin y Beutin, 2011).

Los datos recogidos en Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, identifican 163 genomas ST33 asociados a O91:H14; mientras que la ST442, al igual que en nuestro estudio (ver apartado 4.4. y apartado 4.6.2.1.), aparece asociada a cepas O91:H21 y O146:H21.

A los serotipos O91:[H14]/HNM y O91:[H21] se les asigna el seropatotipo C de la clasificación de Karmali (Karmali *et al.* 2003) por estar asociados a SUH, aunque no a brotes (Bonnet *et al.* 1998; Pradel *et al.* 2001; Mellmann *et al.* 2009; Merkel *et al.* 2010). En nuestro caso, solo los hemos encontrado asociados a casos de diarrea en humanos.

En resumen, los 2 grupos clonales predominantes entre las cepas de ECVT O91 (O91:[H14]/HNM-B1-ST33 y O91:[H21]-B1-ST442) están presentes en España, pero parece que de forma limitada dada su baja prevalencia; el O91:[H14]/HNM-B1-ST33 aparece asociado fundamentalmente al ganado ovino, y el O91:[H21]-B1-ST442 al ganado bovino, y ambos implicados en casos clínicos humanos de gravedad moderada. Demostramos, en el caso del O91:[H14]/HNM-B1-ST33, la alta similitud entre el origen bovino y clínico humano de 2 aislamientos.

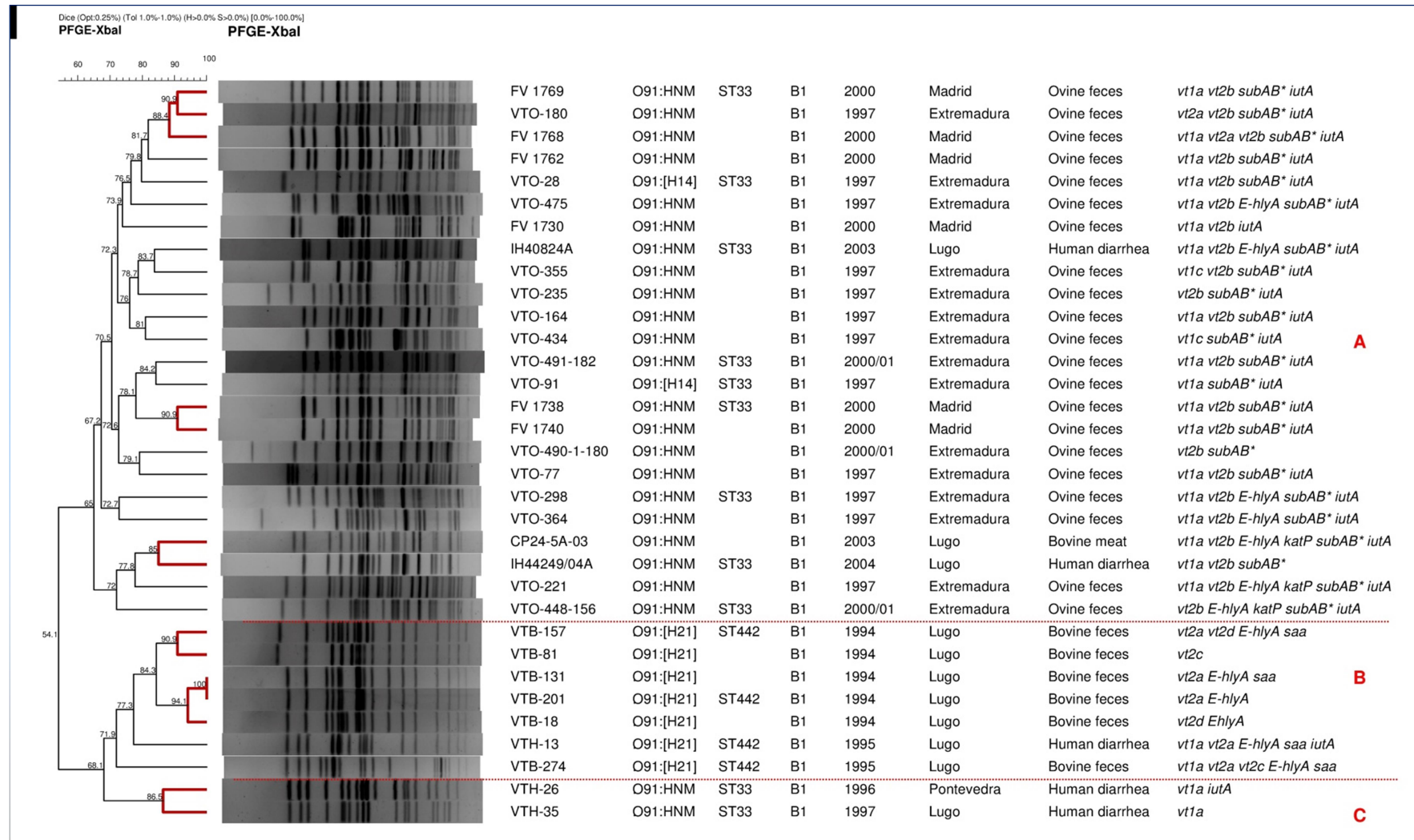


Figura 31. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 33 cepas ECVT O91. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. Los resultados positivos a la variante cromosómica de la subtilasa se indican como *subAB**

4.5.4.8. Grupo clonal O98:[H21]-B1-ST306

Se analizaron 2 cepas de ECVT del serotipo O98:[H21], 1 de origen clínico humano y otra obtenida de las heces de un zorro (Tabla 19), ambas aisladas en Lugo, en los años 2004 y 2009, respectivamente.

Dentro de este serotipo se definió el grupo clonal O98:[H21]-B1-ST306 en base a su filogruppo y ST. A pesar de que el análisis de genes de virulencia mostró que las 2 cepas presentaban un perfil similar (*vt1a*, *eae-ζ1*, *E-hlyA*, *espP*), el dendrograma generado del análisis de sus perfiles de macrorrestricción (Figura 32) mostró una similitud de solo el 76,2%. Adicionalmente, la cepa aislada de zorro fue positiva para *iutA*. Ninguna de las 2 cepas resultó positiva para los genes *vt2*, *katP*, *subAB*, *stcE* o *saa*.

Las 2 cepas del serotipo O98:[H21] fueron fermentadoras de sorbitol y, ambas negativas para la β-glucuronidasa. Una de las 2 cepas (la aislada de heces de zorro) creció en MACSTC y resultó positiva para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27).

En la literatura científica se describen aislamientos de ECVT O98 asociados al ganado bovino, portadores de diferentes antígenos H como O98:H17, O98:H25, O98:H41 (Renter *et al.* 2005; Irino *et al.* 2005; Pigatto *et al.* 2008; Diarra *et al.* 2009); así como un aislamiento de ECVT O98 asociado al ganado ovino portador del antígeno H7 (Blanco *et al.* 2003b). Sin embargo, el serotipo O98:H21 se describe por primera vez asociado a las 2 cepas ECVT aisladas por nuestro grupo (Mora *et al.* 2012a). En Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, figuran 88 genomas ST306 con diferente predicción de serotipo (O45:H2, O84:H2, O108:H2, O150:H2 y O98:H21), concretamente las fuentes de origen asociadas a los O98:H21 son humano, vacuno, medio ambiente y 2 de fauna silvestre (ciervo, reptil).

A este serotipo se le ha asignado el seropatotipo D de la clasificación de Karmali *et al.* (2003), ya que se ha asociado a un cuadro clínico moderado de diarrea.

Como conclusión, aunque la prevalencia de este grupo clonal es baja, se puede considerar un patógeno potencial dado su perfil de genes de virulencia (*vt1a*, *eae-ζ1*, *E-hlyA*, *espP*). Además, se describe por primera vez su presencia en portador de ECVT atípico (zorro).

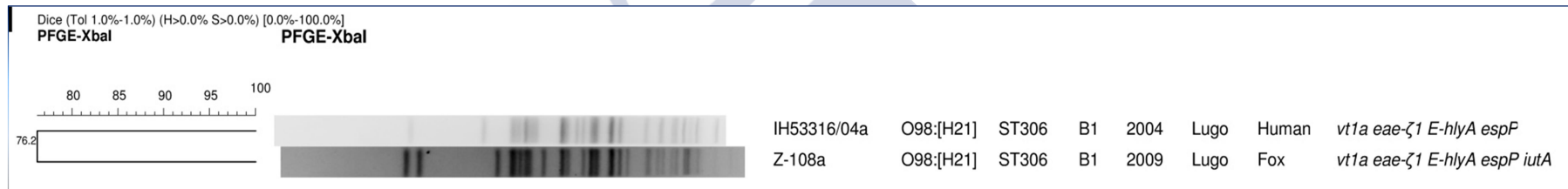


Figura 32. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 2 cepas ECVT O98:[H21]. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupa, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia

4.5.4.9. Grupo clonal O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967

Se analizaron 11 cepas de ECVT del serotipo O103:[H2], 4 de origen clínico humano, 5 aisladas de heces de ganado bovino y 2 de carne de vacuno (Tabla 19). Todas ellas aisladas en Lugo entre los años 1986 y 2005.

Dentro de este serotipo se definió un único grupo clonal (O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967) en base al filogrupo y ST, puesto que las 3 ST determinadas pertenecerían al ST20 Cplx: las ST17 y ST 386 así figuran en la base de MLST y la ST1967, descrita por primera vez en este estudio, constituye una SLV de ellas y una DLV de la ST20. En la Tabla 36 se pueden ver sus diferencias alélicas con respecto a la ST20 (ver también discusión en el apartado 4.6.2.1.). El análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 11 cepas O103:[H2] reflejó la variabilidad dentro de este grupo (63,4% de similitud), con un único clúster (85% de similitud) de 2 cepas O103:H2-B1-ST17, una cepa de origen clínico humano y otra de origen bovino (Figura 33). El análisis de los perfiles de virulencia mostró que las 11 cepas O103:[H2] eran positivas para los genes *vt1a* y *eae-ε1*; además, 7 de las 11 cepas de nuestro estudio eran portadoras de *E-hlyA*, 5 cepas *iutA*, 5 cepas *katP* y 3 cepas *espP*. Ninguna cepa de este grupo clonal resultó positiva para los genes *vt2*, *stcE*, *saa*, ni para *subAB*.

Tabla 36. Combinaciones alélicas de las ST determinadas en las cepas ECVT O103:H2 del presente estudio

<i>adK-fumC-gyrB-icd-mdh-purA-recA</i>	ST ^a	STcplx
6-4-3-18-7-7-6	20	20
6-4-3-17-7-7-6	17	20
91-4-3-17-7-7-6	386	20
6-4-3-17-7-204-6	1967*	None
^a Sombreadas en malva las ST determinadas en las cepas O103:H2 de este estudio. *ST descrita por primera vez en las cepas de nuestra colección		

Fenotípicamente, todas las cepas del presente estudio resultaron ser fermentadoras de sorbitol y positivas para la β-glucuronidasa. Además, la mayoría (10 de 11) resultaron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito y crecieron en MACSTC (Tabla 27). Karama *et al.* (2009) encontraron diferencias por origen geográfico y de aislamiento en relación a la resistencia al telurito de las 91 cepas ECVT O103:H2 analizadas, siendo *terC* positivas el 39% de las cepas de origen bovino y el 69,5% de las humanas de Norte América, frente al 26% de las cepas humanas europeas.

Las 11 cepas O103:[H2] de nuestra colección eran positivas para los genes *vt1a* y *eae-ε1*, comúnmente asociados a las cepas de ECVT O103:H2 (Prager *et al.* 2002; Guth *et al.* 2005;

Irino *et al.* 2007; Karama *et al.* 2008; Iguchi *et al.* 2012; Martins *et al.* 2014). Además, 7 de las 11 cepas de nuestro estudio eran portadoras de *E-hlyA*, 5 cepas *katP* y 3 cepas *espP*, resultados comparables a los de Karama *et al.* (2008), que encontraron una elevada diversidad en los perfiles plasmídicos de las 91 ECVT O103:H2 de su estudio, siendo el 31,8% de las cepas portadoras del gen *katP* y 15,3% *espP*. De hecho, a diferencia de las cepas de ECVT O157:H7, en las que el plásmido pO157 tiene un tamaño de 90 kb y presenta el conjunto completo de genes *E-hlyA*, *katP*, *espP*, y *etp*, las cepas ECVT O103:H2 mostraron que portaban un plásmido equivalente a pO157, pero más pequeño (75 kb), con alguna de la siguientes combinaciones en la mayoría de las cepas: *E-hlyA*, *katP* y *etp*, o *E-hlyA* y *etp* (Karama *et al.* 2008). Este perfil plasmídico (con este tamaño y organización de genes) ya había sido descrito previamente por otros autores en cepas ECVT O103:H2 en Alemania (Prager *et al.* 2002; Beutin *et al.* 2005a). En nuestro estudio ninguna cepa resultó positiva para *vt2*, sin embargo, en la literatura científica existen referencias de cepas ECVT O103:H2 VT2 (Karama *et al.* 2008; Martins *et al.* 2014).

Los ECVT O103 aparecen implicados como agentes diarreagénicos por primera vez en 1988, en terneros (Blanco *et al.* 1988) y en humanos (Pai *et al.* 1988). Es en 1992 cuando se asociaron a casos de SUH en humanas en Francia. Algunos científicos sugirieron en ese momento que el grupo de los ECEP O103 implicados en la diarrea en conejos y los ECVT O103 aislados de casos clínicos humanos tenían un mismo origen, aunque presentaban diferentes mecanismos de adaptación a sus hospedadores (Mariani-Kurkdjian *et al.* 1993). Muchos años más tarde, y mediante la combinación de métodos moleculares (MLST, PFGE y tipado de genes de virulencia por PCR), Beutin *et al.* (2005a) analizaron una colección de cepas de ECEP y ECVT del serogrupo O103, demostrando que los ECEP y ECVT del serotipo O103:H2 constituyen 2 linajes diferentes, próximamente relacionados, que han adquirido recientemente distintos genes de virulencia y han sufrido reorganización en su ADN, lo que se traduce en alta variabilidad en sus patrones de PFGE.

Desde su emergencia, las cepas de ECVT O103 se han aislado del ganado bovino y ovino, así como de casos clínicos humanos en muchos países de todo el mundo (Luzzi *et al.* 1995; Tarr *et al.* 1996; Schmidt *et al.* 1999a; Parma *et al.* 2000; Bettelheim *et al.* 2001; Martins *et al.* 2014), hasta el punto en que este serogrupo se ha convertido en uno de los “no O157” frecuentemente implicado en casos clínicos humanos de muchos países (Eklund *et al.* 2001; Tozzi *et al.* 2003; Beutin *et al.* 2005a; Johnson *et al.* 2006). Según la revisión realizada por Bettelheim (2007), dentro del grupo de ECVT O103 se describen los antígenos H2, H6, H7, H11, H12, H18, H21, H25, H38, H42, H43, y HNT, pero son los serotipos O103:H2 y O103:HNM los predominantemente implicados en casos clínicos humanos de diferente gravedad en numerosos países de todo el mundo (Caprioli y Tozzi 1998). Como ejemplos, el ECVT O103:H2 se aisló de casos de anemia hemolítica y de diarrea no sanguinolenta en Brasil (Guth *et al.* 2005), de un brote de diarrea en Japón (Muraoka *et al.* 2007) y también se aisló de

casos clínicos humanos en otras partes del mundo como Alemania (Beutin *et al.* 2003) o Finlandia (Eklund *et al.* 2001).

En nuestro país, hemos aislado cepas de ECVT O103 asociadas a los antígenos H2 y H21 de cepas de origen humano (Blanco *et al.* 2004). Además, el serotipo O103:H2 fue uno de los más frecuentemente detectados entre las cepas de ECVT aisladas en casos clínicos humanos en Lugo entre los años 2003-2013 (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar). En cuanto a los reservorios, hemos aislado en España cepas ECVTO103:H2, O103:H21 y O103:HNM en ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c), sin embargo, no hemos aislado ECVT O103 ni en el ganado ovino, ni en el ganado caprino en distintos estudios (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Sánchez *et al.* 2009b; Horcajo *et al.* 2010). En la fauna silvestre tampoco detectamos el serotipo O103:H2, pero se aislaron cepas ECVT O103:H28 de las heces de jabalíes (Mora *et al.* 2012a). A diferencia de otros autores, solo hemos aislado cepas de ECVT O103:H2 en carne picada de ternera, y en baja proporción: solo 1 aislamiento ECVT O103:H2 *vt1 eae-ε* (incluido en este estudio) de 95 muestras positivas entre 785 de carne picada de vacuno, analizadas entre 1995-2003 (Mora *et al.* 2007a); y ningún aislamiento positivo entre 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

En un estudio realizado en Finlandia durante el periodo 2003 y 2006, en el que se detectaron 4 casos clínicos humanos producidos por cepas ECVT no O157 en un entorno rural, se demostró la conexión con el ganado bovino. En 1 de esos 4 casos, se aislaron cepas ECVT O103:H2 *vt1 eae-ε E-hlyA* de las muestras de heces de un niño de 7 años con diarrea sanguinolenta, de muestras ambientales y del ganado bovino de la granja (Heinikainen *et al.* 2007). Las cepas ECVT O103:H2 analizadas en nuestro estudio son comparables a las del estudio finlandés: fueron aisladas de casos clínicos humanos y del ganado bovino (heces y carne), en un entorno geográfico ganadero. Las 11 cepas de nuestro estudio fueron *vt1a eae-ε1* y 7 de ellas, además, *E-hlyA*. Heinikainen *et al.* (2007) demostraron mediante PFGE que los perfiles de macrorrestricción de las cepas de origen clínico humano y de la granja de bovino eran prácticamente idénticos. En nuestro caso, también hemos demostrado la similitud (85%) entre 2 cepas de ambos orígenes.

Aunque nosotros no detectamos el ECVT O103:H2 en fauna silvestre (corzo, zorro, jabalí) (Mora *et al.* 2012a), la carne de venado portadora de cepas de este serotipo fue la causante de un brote en Minnesota en 2010, aunque ninguno de los afectados llegó a desarrollar el SUH (Rounds *et al.* 2012). Además, se han aislado cepas de ECVT O103:H2 en otros tipos de carne de caza (de jabalí, corzo, ciervo y liebre) en Alemania (Miko *et al.* 2009; Martin y Beutin, 2011), y lo que es más importante, se ha demostrado mediante PFGE la alta similitud entre cepas ECVT O103:H2 *vt1 eae-ε1* aisladas de carne de jabalí y corzo, con cepas de origen humano y bovino (Miko *et al.* 2009).

Iguchi *et al.* (2012) detectaron 3 grupos clonales entre las cepas ECVT O103 aisladas de pacientes con diferentes procesos gastrointestinales en Japón entre los años 2007 y 2011: O103:H2-ST17 *eae-ε*; O103:H25-ST343 *eae-θ* y O103:H11-ST21/ST723 *eae-β*1. Nosotros solo identificamos un grupo clonal entre las cepas ECVT O103 de nuestra colección, aunque con 3 ST asociadas que pertenecen al mismo ST Cplx. En Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, se relacionaban 2.135 genomas pertenecientes a la ST17, con diferentes predicciones de serotipo (O103:H2 principalmente, pero también O116:H2, O118 or O151:H2, O123 or O186:H2, O4:H2, O45:H2). Los 13 genomas pertenecientes a la ST386 tienen asociado el serotipo O103:H2 y los 331 genomas ST1967 tienen como serotipo predictivo O103:H2 o *uncertain*:H2.

El serotipo O103:H2 se ha asociado a SUH y CH en muchos países (Mariani-Kurkdjian *et al.* 1993; Tarr *et al.* 1996; China *et al.* 1999; Blanco *et al.* 2004; Beutin *et al.* 2004; Jores *et al.* 2005; Kappeli *et al.* 2011; MacDonald *et al.* 2014), por lo que Karmali *et al.* (2003) lo clasificaron como seropatotipo B. Nosotros hemos aislado este tipo de cepas únicamente en casos clínicos de diarrea.

En resumen, nuestros resultados indicarían que el grupo clonal O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967 está presente en el área sanitaria de Lugo y que el ganado vacuno juega un papel epidemiológico importante en el mantenimiento y transmisión de este tipo de ECVT al hombre, dada además la similitud encontrada entre los perfiles de macrorrestricción de 2 cepas de origen clínico humano (IH49694/05A) y bovino (VTB-103). Constatamos, al igual que otros autores, que a pesar de su patrón de virulencia homogéneo (*vt1a*, *eae-ε*1), este grupo clonal presenta una alta diversidad en base a sus ST y perfiles PFGE. Es importante destacar que en este estudio se describe por primera vez la ST1967.

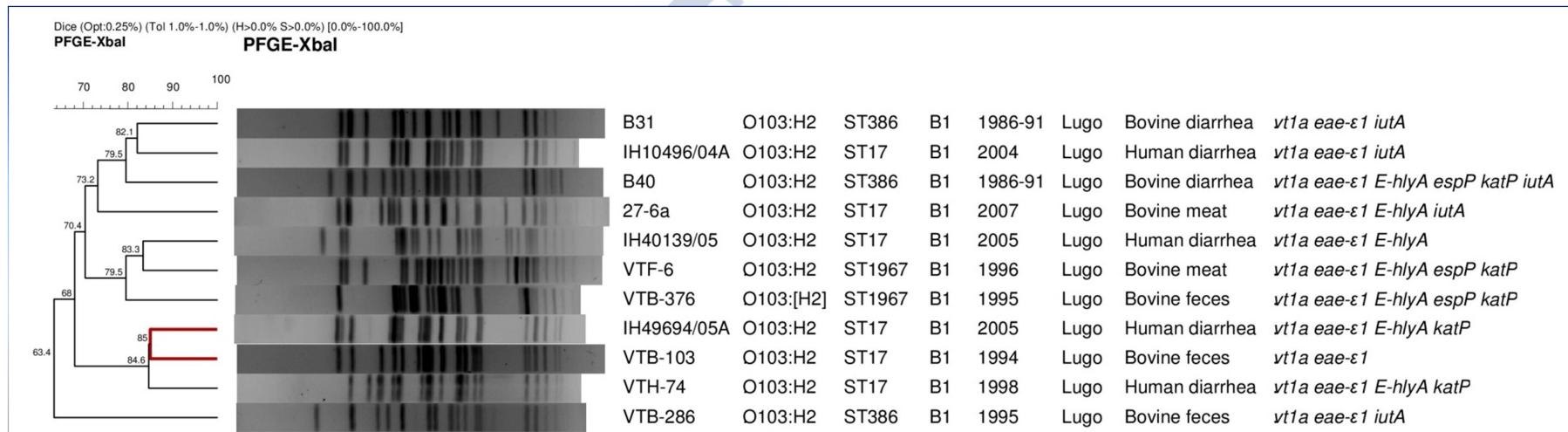


Figura 33. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 11 cepas ECVT O103:[H2]. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupa, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia

4.5.4.10. Grupos clonales O104:H7-B1-ST1817/2283 y O104:H21-B1-ST672

Se analizaron 12 cepas de ECVT del serogrupo O104 que mediante serotipado mostraron 2 serotipos (10 cepas O104:H7 y 2 cepas O104:H21). Diez de las 12 cepas O104 procedían de heces de ganado ovino, 1 de heces de ganado bovino y 1 de heces de ganado bovino con diarrea (Tabla 19).

Dentro de este serogrupo se definieron 2 grupos clonales en base a su serotipo, filogrupo y ST (O104:H7-B1-ST1817/ST2283 y O104:H21-B1-ST672), que en el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 12 cepas O104 (Figura 34) quedaron distribuidas en 2 Grupos (A y B) con tan solo un 57,9% de similitud global entre ellas.

El Grupo A, que se corresponde con el grupo clonal O104:H7-B1-ST1817/ST2283, incluye 10 cepas aisladas de ganado ovino en Extremadura entre los años 1997 y 2002. Las 2 ST detectadas en este grupo clonal (ST1817 y ST2283) constituyen SLV con una única diferencia alélica en el gen *fumC*. La asignación de estas 2 ST las obtuvimos nosotros por primera vez, concretamente la ST1817 en una cepa ECVT de origen ovino del serotipo O117:HNM incluida en este estudio (apartado 4.5.4.13. Grupo clonal O117:HNM-B1-ST1816/ST1817) y la ST2283 en la cepa del serotipo O104:H7 incluida en la Tabla 30. En el trabajo de Bai *et al.* (2016) también encontraron la ST1817 asociada con una cepa ECVT del serotipo O104:H7 aislada de un paciente con diarrea en China y la ST2283 asociada también con cepas ECVT del serotipo O104:H7 aunque, en este caso, aisladas de carne de ovino; dichos aislamientos fueron, como en nuestro caso, portadores del subtipo *vt1c*, variedad de verotoxina asociada al ganado ovino (Brett *et al.* 2003; Urdahl *et al.* 2003). Adicionalmente, 6 de nuestras 10 cepas eran portadoras del gen *katP*. En el dendrograma identificamos 2 clústeres de 3 y 5 cepas, respectivamente, sin embargo, las 10 cepas de este grupo clonal presentaron globalmente una alta heterogeneidad en sus perfiles de macrorrestricción, con solamente un 67,9% de identidad entre ellas.

El Grupo B incluye las 2 cepas del grupo clonal O104:H21-B1-ST672 aisladas de las heces de ganado bovino en Lugo entre los años 1986-1995. Las 2 cepas tenían la secuencia tipo ST672. Esta ST también fue descrita en una cepa ECVT O104:H21 aislada de un SUH (Mellmann *et al.* 2008a). Las 2 cepas de nuestro estudio presentaron una similitud en sus perfiles de macrorrestricción del 80% identidad, con un perfil de genes de virulencia similar (ambas *vt1 vt2a*), aunque una de las cepas mostraba un mayor número de genes de virulencia (la cepa VTB-288 positiva además a *vt2d*, *E-hlyA*, *saa*).

Fenotípicamente, las 12 cepas de ECVT del serogrupo O104 de nuestro estudio resultaron ser positivas para la β -glucuronidasa, pero no todas fermentadoras de sorbitol: 4 de las 10 cepas O104:H7 eran sorbitol negativas; y a diferencia de la cepa O104:H21 causante del brote de CH de Montana del año 1994, que no fermentaba el sorbitol (CDC, 1995b; Feng *et al.* 2001), las 2 cepas O104:H21 de nuestro estudio eran sorbitol positivas. Además, las 12 cepas

crecieron en MACSTC y resultaron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27), sin embargo, tanto las cepas O104:H7 como las O104:H21 aisladas por Rump *et al.* (2012) no poseían los genes de resistencia al telurito *terD*.

Los datos publicados sobre ECVT O104 eran bastante escasos hasta que ocurrió el brote del año 2011 en Alemania, puesto que este serogrupo se ha detectado en muy pocas ocasiones en humanos a nivel mundial (Bettelheim 2007). Según los datos publicados por la ECDC y EFSA (2011), hubo 10 casos de infectados con ECVT O104 en la Unión Europea y Noruega en el período 2004-2009. Dichos casos de ECVT O104 se registraron en Austria (1 caso en 2010), Bélgica (1 caso en 2008), Dinamarca (1 caso en 2008), Finlandia (1 caso en 2010), Francia (1 caso en 2004), Noruega (1 caso en 2006 y 3 casos en 2009) y Suecia (1 caso en 2010). Sólo 2 de los casos de ECVT O104 eran del serotipo O104:H4 (en Finlandia en 2010 y en Francia en 2004). El caso de Finlandia se relacionó con una infección adquirida durante un viaje a Egipto.

El serogrupo O104 adquirió una enorme relevancia con el brote de Alemania porque afectó a aproximadamente 4.000 personas, principalmente en dicho país, produciendo más de 900 casos de SUH y 54 muertes (Karch *et al.* 2012). La cepa O104:H4, causante del brote, combinaba la virulencia de patotipos diferentes (ECVT y ECEA) y además carecía de la isla de patogenicidad LEE (Bielaszewska *et al.* 2011a; Scheutz *et al.* 2011). Se especuló con la idea de que el brote fuera causado por una cepa de un ECEA que adquirió el bacteriófago que codifica para la verotoxina VT2a (Scheutz *et al.* 2011). Además, esta cepa pertenecía a un serotipo (O104:H4) y secuencia tipo (ST678) raramente detectado en pacientes humanos y nunca descrito en cepas aisladas de animales, ni de alimentos (Bielaszewska *et al.* 2011a; Scheutz *et al.* 2011). Existen referencias de este serotipo en cepas enteroagregativas y productoras de VT2 aisladas en Alemania en 2001 (Mellmann *et al.* 2008a), Georgia en 2009 (Scheutz *et al.* 2011), Italia en 2009 (Scavia *et al.* 2011), Finlandia en 2010 (Scheutz *et al.* 2011) y Francia (Scheutz *et al.* 2011); y en otra cepa aislada en Corea en 2005 productora de VT1 y VT2, pero que no era enteroagregativa (Bae *et al.* 2006). También se habían aislado cepas enteroagregativas del serotipo O104:H4, pero no productoras de verotoxinas en la República Centroafricana entre los años 1995 y 1996 (Bielaszewska *et al.* 2011a), en Dinamarca en 2000 (Scheutz *et al.* 2011) y en Mali en 2009 (Scheutz *et al.* 2011). Dentro del serogrupo O104, otros serotipos diferentes se asociaron a casos humanos, como el O104:H2 (Scotland *et al.* 1988), O104:H21 (Beutin *et al.* 2004; CDC, 1995b) y O104: HNM (Bockemuhl *et al.* 1992).

En España el aislamiento del ECVT O104 es también poco común. Hasta la fecha no hay referencias del aislamiento del ECVT O104:H4, ni en cepas de origen clínico, ni de origen animal, ni de alimentos (Blanco *et al.* 2003b, 2004b; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Mora *et al.* 2005, 2007a, 2011, 2012a; Herrera 2015). Sin embargo, aunque pocas, sí que hay referencias de la detección del ECVT O104 con otros antígenos: el ECVT O104:H7 se ha asociado a cepas de origen ovino (Blanco *et al.* 2003b; Rey *et al.* 2003; Mora *et al.* 2011) y recientemente lo detectamos en cepas aisladas de carne de vacuno (1 cepa aislada entre las 200 de carne de vacuno analizadas) y de carne de ovino (1 cepa aislada entre las 171 muestras de carne de

importación analizadas) (Herrera, 2015), pero no lo detectamos en carne de cerdo, de ave, ni en productos lácteos ni agrícolas entre las 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012 (Herrera, 2015). Otro serotipo detectado en España dentro del serogrupo O104 es el O104:H21, que lo identificamos en cepas aisladas de ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c), aunque no lo detectamos ni en ganado ovino ni en fauna silvestre (Blanco *et al.* 2003b; Rey *et al.* 2003; Mora *et al.* 2011), y tampoco lo detectamos entre las 1.253 muestras de alimentos analizadas entre 2009-2012 (incluyendo carne de cerdo, de ave, ni en productos lácteos ni agrícolas) (Herrera, 2015). Tampoco identificamos los serotipos O104:H7 y O104:H21 entre las 5.054 muestras analizadas entre los años 1992-1999 en el HULA (Blanco *et al.* 2004), ni entre las 12.945 muestras analizadas entre los años 2005-2014 (datos LREC, no publicados) en este mismo hospital.

Aunque nosotros no hemos identificado el serotipo O104:H21 entre cepas de ECVT de origen humano, sí ha sido descrito por otros autores (Rump *et al.* 2012). Destaca el brote que tuvo lugar en Montana en 1994 producido por cepas de este serotipo (primer caso atribuido a un ECVT O104:H21, y primer brote descrito de un ECVT no O157 en EE.UU.) (CDC, 1995b). El serotipo O104:H21 también se ha identificado, igual que en nuestro caso, en cepas de ECVT aisladas de ganado bovino en Austria (ECDC y EFSA, 2011), de terneros en EE.UU. (Rump *et al.* 2012) y de carne de ganado bovino (Martin y Beutin, 2011). En cuanto al serotipo O104:H7, aparece asociado por otros autores a casos esporádicos de diarrea en humanos en estudios realizados (Hussein 2007; Miko *et al.* 2013).

En Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, estaban relacionados 10 genomas de la ST1817 asociados al O104:H7 y 7 de la ST672 con predicción de serotipo O104:H21. No hay ningún genoma perteneciente a la ST2283. En cuanto a la ST1817, como se indicó anteriormente, aparece solamente asociada a 10 genomas.

El serotipo O104:H21 está asociado a SUH aunque no a brotes, por lo que Karmali *et al.* (2003) lo asignaron al seropatotipo C. Al ECVT O104:H7 se le ha asignado el seropatotipo D de la clasificación de Karmali *et al.* (2003) ya que no está asociado ni a enfermedades graves, ni a brotes.

En conclusión, el grupo clonal O104:H7-B1-ST1817/ST2283 parece estar asociado al ganado ovino y el O104:H21-B1-ST672 al ganado bovino, presentan baja prevalencia y, por sus genes de virulencia, las cepas de nuestra colección presentes en España serían potencialmente patógenas para seres humanos. Es importante destacar que en este estudio se asociaron por primera vez las ST1817 y ST2283 al serotipo O104:H7, aunque recientemente otros autores también las detectaron en China en cepas de ECVT O104:H7 (Bai *et al.* 2015). Resaltar el hecho de que la ST1817 la hemos encontrado asociada también a las cepas de ECVT del serotipo O117:HNM, y que junto a las ST1816 y ST2283 forman un grupo de 3 SLV = complejo clonal, en el que la ST1817 sería predictivamente la fundadora (ver discusión en el apartado 4.6.2.1.).

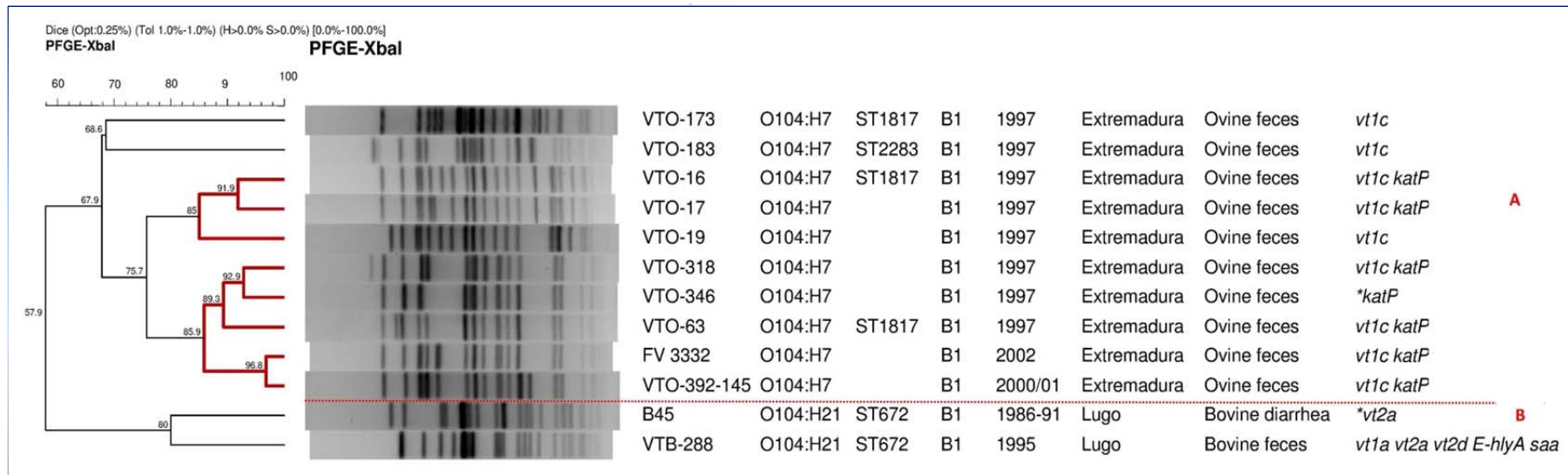


Figura 34. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 12 cepas ECVT O104. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento y genes de virulencia. *Cepas originariamente positivas para el gen *vt1*

4.5.4.11. Grupo clonal O111:[H8]-B1-ST16

En el presente estudio se incluyeron 11 cepas de ECVT del serotipo O111:[H8], 7 de origen clínico humano, 2 de heces de ganado bovino y 2 de carne de vacuno. Todas ellas fueron aisladas en Lugo entre los años 1986 y 2007 (Tabla 19).

Dentro de este serotipo se definió un único grupo clonal en base a su filogrupo y ST (O111:[H8]-B1-ST16), que en el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 11 cepas O111:[H8] mostró una identidad del 72,7% entre ellas, con 2 pequeños clústeres (>85% similitud) de 2 y 3 cepas, respectivamente. Este último clúster incluía una cepa aislada de carne de vacuno y 2 cepas de origen clínico humano (Figura 35).

En cuanto a los genes asociados a la virulencia, las 11 cepas O111:[H8] eran portadoras de los genes *vt1a* y *eae-θ*; además 5 de las 11 cepas eran portadoras del subtipo *vt2a*. Por tanto, las cepas de este serotipo eran portadoras de uno o varios de los subtipos de verotoxinas asociados a síntomas clínicos más graves en humanos (Friedrich *et al.* 2003; Jelacic *et al.* 2003; Bielaszewska *et al.* 2013). Seis de las 11 cepas eran portadoras del gen *E-hlyA* y 5 cepas *iutA* positivas. Ninguna cepa O111:[H8] resultó positiva para los genes *espP*, *katP*, *subAB* (ni la variante plasmídica ni la cromosómica), *stcE* o *saa*.

Fenotípicamente las 11 cepas ECVT del serotipo O111:[H8] de nuestra colección resultaron ser fermentadoras de sorbitol, y 10 de las mismas positivas para la β-glucuronidasa. Además, las 11 cepas crecieron en MACSTC y fueron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27); esto concuerda con los resultados obtenidos por Zhang *et al.* (2007) que describieron que las 64 cepas O111:H8 de aislados clínicos (diarrea o SUH) obtenidas entre 1955 y 2005 crecían en MACSTC y poseían los genes de resistencia al telurito, sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, 6 de esas cepas no fermentaban el sorbitol.

Entre los ECVT no O157, el serogrupo O111 es de los más comúnmente implicados en CH y SUH en EE.UU. (Brooks *et al.* 2005) e infecciones en Europa (Karch *et al.* 1999a;), Asia (Kato *et al.* 2005; Jeon *et al.* 2006) y Australia (Paton *et al.* 1996). Numerosos brotes se han atribuido a este patógeno (Tanaka *et al.* 1989; Viljanen *et al.* 1990; Caprioli *et al.* 1994; CDC, 1995a; 2012a; Wight *et al.* 1997; Kato *et al.* 2005; Jeon *et al.* 2006; Yahata *et al.* 2015), de hecho las cepas de ECVT pertenecientes a los serotipos O26:[H11], O103:[H2], O111:[H8], O118:[H16], O121:[H19], O145:[H28] y O157:[H7] se encuentran entre las más frecuentemente implicadas en brotes y en casos de CH y SUH a nivel mundial (Mead *et al.* 1999; Maidhof *et al.* 2002; Tarr *et al.* 2002; CDC, 2009; EFSA, 2009; EFSA *working group*, 2010).

Según la revisión de Bettelheim (2007), se han descrito cepas ECVT del serogrupo O111 con los antígenos HNM, H2, H7, H8, H11, H16, H21, H30, H45 y HNT. Sin embargo, las

cepas móviles de este serogrupo pertenecen principalmente al serotipo O111:H8 (Zhang *et al.* 2007), aunque la amplia mayoría de los aislados de ECVT O111 son no móviles (Blanco *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007). En nuestro caso únicamente detectamos cepas del serogrupo O111 no móviles, con el antígeno H8 determinado genotípicamente ([H8]).

En nuestro país, el O111:H8/HNM fue identificado por nuestro grupo como uno de los serotipos más frecuentes entre las cepas de ECVT aisladas de casos clínicos humanos en Lugo en los estudios realizados entre 1992 y 1999 (Blanco *et al.* 2004; Mora *et al.* 2011) y entre los años 2003-2013 (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar). En cuanto a los reservorios, hemos aislado en España cepas ECVT O111:HNM en ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c), sin embargo, no hemos aislado cepas ECVT O111 en los distintos estudios realizados en ganado ovino y caprino (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Horcajo *et al.* 2010). Tampoco aislamos cepas de ECVT O111 en la fauna silvestre (Mora *et al.* 2012a). Aislamos cepas de ECVT O111:HNM en carne de ternera picada en baja proporción, con solo 2 aislamientos de ECVT O111:HNM *vt1 eae- θ* de 95 muestras positivas entre 785 de carne de vacuno analizadas entre 1995 y 2003 (Mora *et al.* 2007a) (incluidas en este estudio), y ningún aislamiento positivo entre las 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015). En otros países el ECVT O111 se identifica asimismo en el ganado vacuno (Schoonderwoerd *et al.* 1988; Wells *et al.* 1991; Sandhu *et al.* 1996; Wieler *et al.* 1996; Kobayashi *et al.* 2003; Bettelheim, 2007). Además Shen *et al.* (2015) en EE.UU. aislaron cepas de ECVT O111:H8 en el 21,29% de las 155 muestras de heces de animales, incluyendo ganado bovino, ovino, porcino, caprino, antílope, okapi y corzo.

Las 11 cepas de ECVT O111:[H8] de nuestra colección eran portadoras del gen *eae* subtipo θ , comúnmente asociado a este serotipo (Tarr y Whittam, 2002; Bibbal *et al.* 2015). Además, todas las cepas eran portadoras del gen *vt1* y 5 eran adicionalmente *vt2*. De acuerdo con diferentes estudios, la mayoría de las cepas ECVT O111 portan el gen *vt1* (solo o en combinación con *vt2*), lo que sería debido a que el profago VT1 de ECVT O111 es defectivo, y este hecho le conferiría estabilidad en el cromosoma de ECVT (Creuzburg *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007); sin embargo, el profago VT2 que es más inestable se puede perder progresivamente del genoma (Watahiki *et al.* 2014).

Es interesante destacar el estudio de Moller Nielsen *et al.* (2005) en Dinamarca en el año 2003, en el que aislaron cepas de ECVT O111:HNM con características genéticas muy similares a las de nuestro estudio (*vt1 eae- θ E-hlyA espP katP*) de las heces de una niña de 16 meses con diarrea no sanguinolenta y vómitos, y del ganado bovino de la granja en la que había estado jugando y bebiendo leche. Además, los autores demostraron que los perfiles PFGE de las cepas de ambos orígenes eran indistinguibles. Nosotros también hemos identificado cepas de patología humana con alta similitud con una cepa aislada de carne de vacuno.

Es de resaltar el hallazgo de una cepa de ECVT del serotipo O111:H8 productora de CTX-M-15 en Francia, aislada del contenido fecal de un ternero que murió afectado por un cuadro diarreico grave (Valat *et al.* 2012) y cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado (Valat *et al.* 2016).

En Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, estaban relacionados 1.333 genomas ST16 de distintos orígenes, principalmente humano y bovino, asociados al serotipo O111:H8.

Aunque nosotros únicamente detectamos cepas ECVT O111:H8 en pacientes con diarrea, este serotipo está comúnmente vinculado a SUH y a brotes (Benenson, 1995; Brooks *et al.* 2004), por lo que se le asignó el seropatotipo B de la clasificación de Karmali *et al.* (2003).

Por tanto, este grupo clonal está presente en nuestra área sanitaria, tiene como reservorio al ganado bovino, y a la carne de vacuno como vía potencial de transmisión al hombre dada la alta similitud que encontramos en los perfiles de macrorrestricción de las cepas de ambos orígenes.



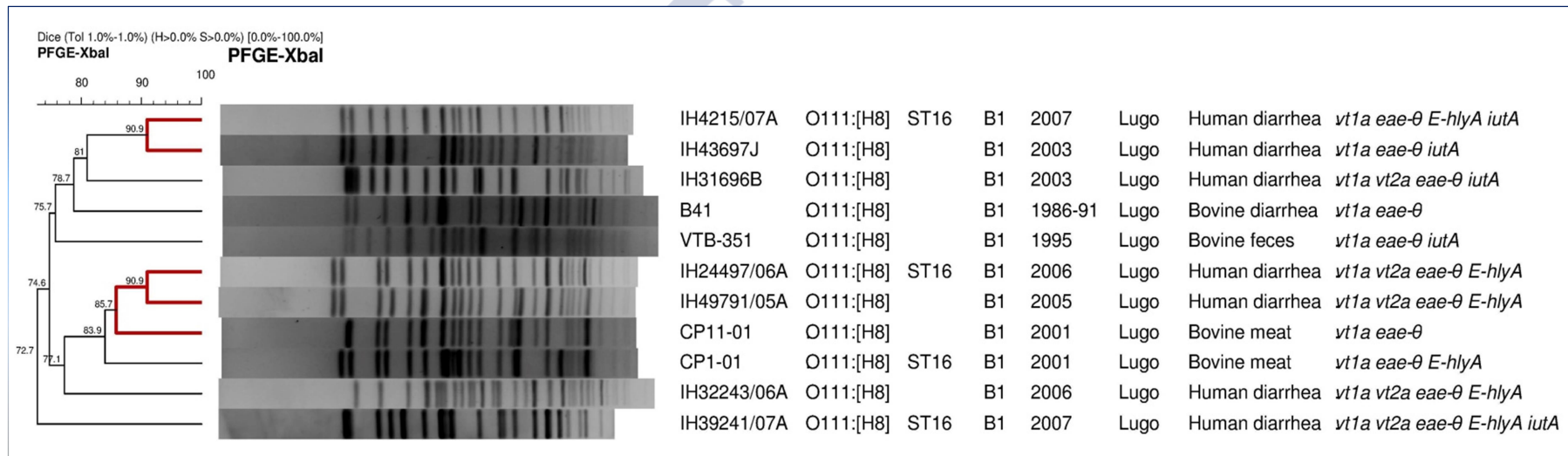


Figura 35. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 11 cepas ECVT O111:[H8]. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia

4.5.4.12. Grupo clonal O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821

Se analizaron 13 cepas de ECVT del serotipo O113:H21, 6 de origen clínico humano, 5 aisladas de heces de ganado bovino y 2 de carne de vacuno (Tabla 19). Todas ellas fueron aisladas en Lugo entre los años 1994 y 2007.

Dentro de este serotipo se definió un único grupo clonal (O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821) en base a su filogrupo y ST, puesto que las 3 ST estarían agrupadas en el ST155 Cplx, incluida la ST1821 asignada por primera vez en este estudio y que constituye un SLV de la ST56 y DLV de la ST223 (ver apartado 4.6.2.1. Estructura y relaciones genéticas de la población de ECVT). El dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 13 cepas O113:H21 mostró una alta diversidad genética (68,8% de similitud entre ellas) con 2 clústeres (similitud >85%) de 2 y 7 cepas, respectivamente, uno de los cuales incluía cepas de origen bovino y clínico humano (Figura 36). El análisis de los perfiles de virulencia mostró que las 13 cepas O113:H21 eran positivas para *vt2* (3 del subtipo *vt2a*, 1 *vt2c* y 9 *vt2d*); 11 cepas fueron *espP* positivas, y 3 cepas resultaron positivas para los genes *E-hlyA*, *subAB* (variante plasmídica) y *saa*. Ninguna cepa O113:H21 resultó positiva para los genes *vt1*, *eae*, *katP*, *stcE*, *iutA*, ni para la variante cromosómica de la subtilasa.

Fenotípicamente las 13 cepas ECVT O113:H21 de nuestro estudio resultaron ser fermentadoras de sorbitol y positivas para la β -glucuronidasa. Además, 10 de las 13 cepas crecieron en MACSTC y resultaron positivas para los genes *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27). A diferencia de nuestros resultados, en el estudio realizado por Feng *et al.* (2014) de 65 cepas O113:H21 de diferentes orígenes, observaron que solamente 5 cepas eran positivas para el gen *terE* del cluster de resistencia, lo que los llevó a sugerir que la mayoría de las cepas O113:H21 eran sensibles al telurito.

Según la revisión de Bettelheim (2007), se han aislado cepas de ECVT del serogrupo O113 portadoras de los antígenos HNM, H2, H4, H5, H6, H7, H11, H17, H18, H19, H21, H27, H32, H53 y HNT, pero a pesar de que muchos de estos serotipos se han visto implicados en infecciones humanas, es el O113:H21 el más frecuentemente detectado. Curiosamente, fue de los primeros serotipos asociados a cepas ECVT patógenas (Karmali *et al.* 1985), pero su importancia epidemiológica estuvo subestimada hasta finales de los años 90, momento en el que se vio implicado en un pequeño brote de SUH ocurrido en Australia (Paton *et al.* 1999). De hecho, el O113:H21 se ha asociado a infecciones de tipo intestinal y extraintestinal en muchos países (Hogan *et al.* 2001; Blanco *et al.* 2003; Feng *et al.* 2014).

En nuestro país, el O113:H21 fue identificado por nuestro grupo entre los serotipos más frecuentes asociados a las cepas de ECVT aisladas de casos clínicos humanos en Lugo en los estudios realizados entre 1992 y 1999 (Blanco *et al.* 2004; Mora *et al.* 2011) y entre los años 2003-2013 (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar). En cuanto a los reservorios, hemos

aislado en España cepas ECVT O113 en ganado bovino con los antígenos HNM, H4, H7 y H21, siendo el serotipo O113:H21 el más frecuente en un estudio realizado en 514 cepas ECVT aisladas de ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c), sin embargo, no hemos aislado cepas de ECVT O113 en distintos estudios realizados en el ganado ovino y caprino (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Horcajo *et al.* 2010). En la fauna silvestre tampoco detectamos el ECVT O113 (Mora *et al.* 2012a). Solo hemos aislado cepas de ECVT O113:H21 en carne picada de ternera, y en baja proporción: solo 2 aislamientos (incluidos en esta colección) entre las 149 cepas de ECVT aisladas de carne picada de vacuno en la ciudad de Lugo, analizadas entre 1995-2009 (Mora *et al.* 2007a, Herrera, 2015). En un estudio posterior realizado entre 2009-2012, aislamos 2 ECVT O113:H21 de carne de vacuno y 1 ECVT O113:H4 de carne de porcino, sin embargo, no aislamos el ECVT O113 en carne de ave, productos agrícolas, ni en productos lácteos entre las 1.253 muestras analizadas (Herrera, 2015).

Al igual que en nuestro caso, el ECVT O113 se ha asociado frecuentemente al ganado bovino (dos Santos *et al.* 2010; Fernández *et al.* 2010). En Brasil, el serotipo O113:H21 es uno de los más frecuentemente detectados en cepas aisladas de terneros (Cerqueira *et al.* 1997; Irino *et al.* 2005); también se detectó en Argentina en heces de ganado bovino (Blanco *et al.* 2004b), y otros autores identificaron cepas de este serotipo en terneros con infecciones gastrointestinales en Australia (Hornitzky *et al.* 2005). En Alemania es uno de los serotipos más frecuentemente detectados en alimentos (Werber *et al.* 2008a), donde también se ha reportado el aislamiento de cepas ECVT O113:H21 de carne de caza (ciervo, jabalí y liebre) (Miko *et al.* 2009; Martin y Beutin, 2011), y lo que es más importante, se demostró mediante PFGE la alta similitud (>85%) entre cepas ECVT O113:H21 aisladas de carne de corzo con cepas de origen bovino, y de cepas aisladas de rumiantes silvestres con carne de porcino, carne de vacuno y con cepas de origen humano (Miko *et al.* 2009). Nosotros también encontramos en el presente estudio alta identidad genética entre cepas de ECVT O113:H21 de origen clínico humano y bovino (heces y carne de vacuno) (Figura 36). También se han aislado este tipo de cepas de productos vegetales como espinacas (Feng *et al.* 2011a).

Las cepas de ECVT O113:H21 se caracterizan por carecer de la isla de patogenicidad LEE, y por tanto del gen *eae*. A pesar de esta carencia, su implicación en casos de SUH (Karmali *et al.* 1985; Paton *et al.* 1999; Newton *et al.* 2009) hizo que se les presupusiera la presencia de otros factores de adherencia y genes de virulencia. De hecho, los genes *sab* (que codifica para una proteína autotransportadora de membrana externa que favorece la formación de biofilm), *saa* (que codifica para una adhesina aglutinante específica de ECVT), *epeA* (que codifica para una proteína autotransportadora) y *subAB* (que codifica para la citotoxina subtilasa) fueron originariamente descritos en cepas O113:H21. También se ha descrito la presencia del gen *E-hlyA* que codifica para la enterohemolisina. Sin embargo, aunque todos estos genes se encuentran generalmente asociados a cepas ECVT *eae* negativas (Steyert *et al.* 2012), no todas las cepas O113:H21 son portadoras de los mismos. Esto es lo que encontraron Feng *et al.*

(2014) en una colección de 65 cepas ECVT O113:H21 de diferentes orígenes (ambientales, alimentos y origen clínico humano) procedentes de distintos países. Después de analizar 41 marcadores genéticos (incluidos los genes arriba descritos), no encontraron una asociación clara de los mismos con respecto a cepas patógenas o ambientales, y solo se encontraron algunos genes en un número limitado de cepas. En el presente estudio, se examinó la presencia de los genes *vt1*, *vt2*, *eae*, *espP*, *E-hlyA*, *subAB*, *katP*, *stcE*, *saa*, *iutA*. Diez de las 13 cepas fueron positivas únicamente para *vt2* o *vt2*, *espP*. Solo 3 cepas (2 de origen clínico y 1 aislada de carne de vacuno) portaban adicionalmente los genes *E-hlyA*, *subAB* (variante plasmídica) y *saa*. Los diferentes estudios sobre cepas de ECVT O113:H21 confirman que la mayoría de los aislados portan *vt2* únicamente, aunque algunas cepas son también *vt1* (Miko *et al.* 2009; dos Santos *et al.* 2010; Feng *et al.* 2014). En nuestro caso, todas las cepas fueron *vt2*, y como Feng *et al.* (2014) encontramos las 3 variedades más frecuentemente implicadas en patología humana: *vt2a*, *vt2c* y *vt2d* (Bielaszewska *et al.* 2006; Persson *et al.* 2007).

En Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, estaban relacionados 62 genomas ST56 asociados a varios serotipos, aunque la mayoría portan H21. De los 70 genomas asociados a la ST223, la mayoría predicen el serotipo O113:H21, aunque aparecen otros (O18:H21, O25:H21, O34:H12, O38:H30, O78:H18, O86:H21, O132:H16; O154:H21; O157:H43; O159:H21, O175:H21). Por último, no figuran genomas en relación con la ST1821, únicamente nuestra asignación a la cepa incluida en este estudio. En el trabajo de Bai *et al.* (2016) se refleja esta diversidad genética dentro del grupo de cepas ST56; los autores encuentran cepas ECVT de la ST56 de los serotipos O2:H21, O6:H14, O78:H21, O78:H8, ONT:H7, O78:H45 y O8:H16 aisladas de yaks en China. En ese mismo trabajo aparecen también cepas ECVT de la ST223 pertenecientes a los serotipos O158:H16 y O127:H8 aisladas de yaks.

Aunque nosotros únicamente detectamos cepas de ECVT O113:H21 en pacientes con diarrea, como ya se indicó anteriormente, este serotipo está considerado uno de los serotipos no O157 implicados en SUH, pero no se ha asociado a grandes brotes (Paton *et al.* 1999; Newton *et al.* 2009), por lo que en la clasificación de Karmali *et al.* (2003) aparece asignado al seropatotipo C.

En resumen, las cepas ECVT del grupo clonal O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821 tienen como principal reservorio el ganado bovino. Demostramos además el potencial patógeno de las mismas, dada la alta similitud encontrada en los perfiles de macrorrestricción y genes de virulencia de las cepas de origen clínico humano y bovino de nuestro entorno geográfico.

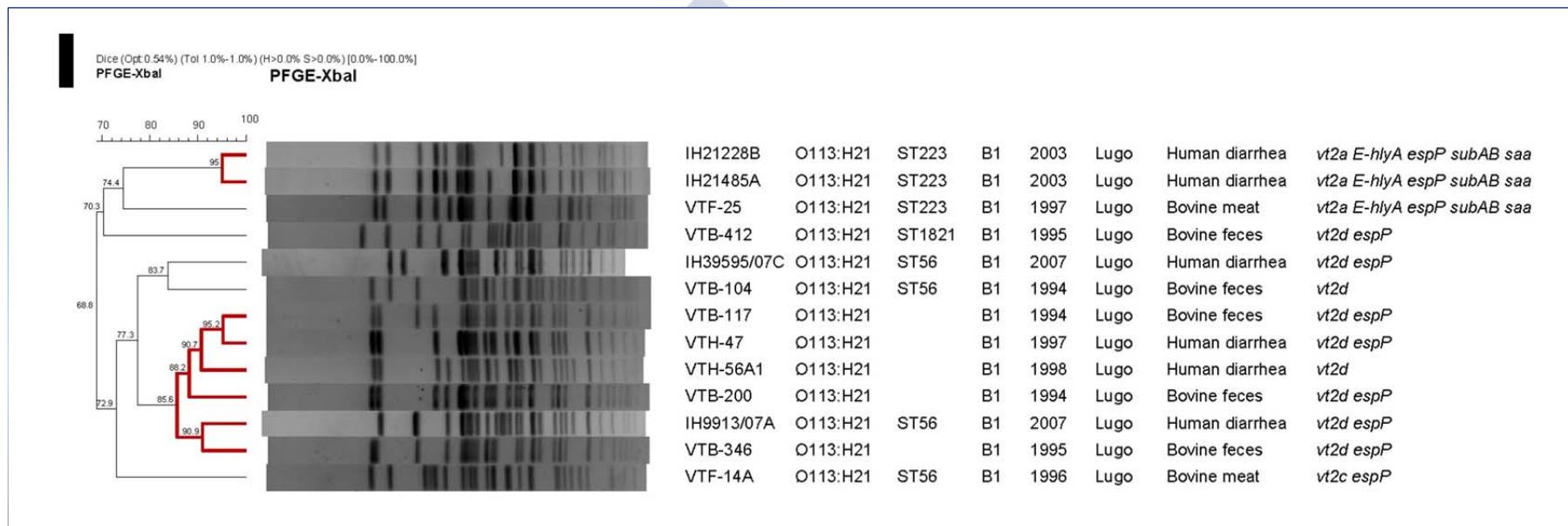


Figura 36. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 13 cepas ECVT O113:H21. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia

4.5.4.13. Grupo clonal O117:HNM-B1-ST1816/ST1817

Se analizaron 9 cepas de ECVT del serotipo O117:HNM. Todas ellas obtenidas de heces de ganado ovino en Extremadura entre los años 1997 y 2001 (Tabla 19).

Dentro de este serotipo se definió un único grupo clonal (O117:HNM-B1-ST1816/ST1817) en base a su filogrupo y ST, puesto que las 2 ST detectadas en este grupo clonal (ST1816 y ST1817) constituyen SLV con una única diferencia alélica en el gen *recA* (Tabla 30). Estas 2 ST fueron asignadas por primera vez a las cepas del presente estudio. Como se comentó en el apartado 4.5.4.10., hay que destacar el hecho de que la ST1817 la hemos encontrado también asociada a las cepas de ECVT del serotipo O104:H7, y que junto a las ST1816 y ST2283 forman un grupo de 3 SLV = complejo clonal, en el que el ST1817 sería predictivamente el fundador (ver discusión en el apartado 4.6.2.1. Estructura y relaciones genéticas de la población de ECVT).

En el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 9 cepas O117:HNM (Figura 37) encontramos únicamente un 74,7% de similitud entre ellas, a pesar de tratarse de un grupo homogéneo en cuanto a origen de aislamiento y perfil de genes de virulencia, con únicamente 2 clústeres de similitud $\geq 85\%$. Las 9 cepas eran portadoras de *vt1c*, variedad de verotoxina asociada al ganado ovino (Brett *et al.* 2003; Urdahl *et al.* 2003) y a humanos, principalmente con diarrea sin complicaciones, o con portadores asintomáticos (Friedrich *et al.* 2003; Beutin *et al.* 2004). Adicionalmente, 6 de las 9 cepas fueron positivas para el gen *katP* y una de ellas portadora de la variante cromosómica del gen *subAB*. Ninguna cepa O117:HNM resultó positiva para los genes *vt2*, *eae*, *E-hlyA*, *espP*, *stcE*, *saa*, *iutA* ni para la variante plasmídica de la subtilasa. Tampoco resultaron positivas para el gen *fliC_{H7}* que codifica para el antígeno H7, a pesar de la sospecha de que podrían portar este gen dada la similitud con el grupo clonal O104:H7-B1-ST1817/ST2283.

Fenotípicamente las 9 cepas ECVT O117:HNM de nuestra colección resultaron ser fermentadoras de sorbitol y 8 positivas para la β -glucuronidasa. Las 9 cepas crecieron en MACSTC y fueron positivas para los genes *terB/D* del clúster que codifica para la resistencia al telurito (Tabla 27).

Los datos publicados del ECVT O117 son escasos ya que es un serogrupo detectado en muy pocas ocasiones en el mundo, por lo que Bettelheim (2007) en su revisión lo incluyó entre los serogrupos descritos menos de 30 veces, y lo asoció a terneros y ovino sanos. Nielsen *et al.* (2006) detectaron el ECVT O117 en el 4% de cepas de ECVT aisladas de casos de infecciones esporádicas en un estudio realizado en Dinamarca entre 2003 y 2005. El ECVT O117 portador del antígeno H7 es una causa de diarrea persistente en viajeros que visitan lugares tropicales (Dallman *et al.* 2013). Este serotipo también fue el causante de diarrea persistente en pacientes daneses que viajaron a Asia, África y Cuba, por lo que Olesen *et al.* (2005) llegaron a la conclusión de que el ECVT O117:H7 debería ser considerado a la hora de

diagnosticar pacientes que retornan de África y Asia con diarrea acuosa de larga duración. En Inglaterra, se describen pocos casos de ECVT O117:H7, solamente 13 casos entre 2009 y 2013 frente a los 4.050 casos de ECVT O157 en el mismo período, estos casos se asociaron a viajes a zonas con alta prevalencia del ECVT O117:H7, sin embargo, en 2014 se detectó un incremento del ECVT O117:H7, con 9 casos de infección por ECVT O117:H7, pero no asociados a viajes, sino que 8 de los 9 casos se asociaron a transmisión por relaciones sexuales (Simms *et al.* 2014). Por tanto, en la mayoría de los estudios las cepas patógenas de ECVT O117 aparecen ligadas al antígeno H7, sin embargo, en nuestro caso las cepas analizadas eran HNM y al analizarlas genotípicamente para el gen *fliC_{H7}* resultaron negativas.

En nuestro país el aislamiento de cepas de ECVT del serogrupo O117 tampoco es muy común. En el estudio realizado entre 1992 y 1999 (Blanco *et al.* 2004) en pacientes del HULA, se aislaron únicamente 1 cepa ECVT O117:HNM y otra ECVT O117:H28 entre las 5.054 muestras analizadas. En un segundo estudio realizado en este mismo hospital entre los años 2003 y 2013, únicamente aislamos 1 cepa ECVT del serogrupo O117 portadora del antígeno H3 en un caso clínico humano de entre las 391 cepas ECVT obtenidas de 13.691 muestras analizadas (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar). En cuanto a los reservorios, en un estudio realizado por nuestro grupo en el año 1997 en el que se analizaron 1.300 muestras de heces de ganado ovino, el serotipo O117:HNM fue uno de los más frecuentemente detectados (16 cepas ECVT aisladas) (Blanco *et al.* 2003b). En otro estudio realizado por Rey *et al.* (2003) en el que analizaron 697 muestras de heces de ganado ovino entre 2000 y 2001, el serotipo O117:HNM también fue uno de los detectados con mayor frecuencia entre las 253 cepas ECVT aisladas. Por otro lado, en un estudio en el que se analizaron 514 cepas ECVT de origen vacuno identificamos el ECVT O117:H28 en 2 cepas (Blanco *et al.* 2004c). En fauna silvestre únicamente se aisló 1 cepa ECVT O117:H7 de las heces de un jabalí entre las 701 muestras analizadas (incluido jabalíes, corzos y lobos) (Mora *et al.* 2012a). No hemos aislado cepas de ECVT O117 en carne picada de ternera entre las 785 muestras de carne picada de vacuno analizadas entre 1995-2003 (Mora *et al.* 2007a); y tampoco obtuvimos ningún aislamiento positivo entre 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

En Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, la ST1816 no está asociada a ningún genoma y únicamente figura nuestra asignación a la cepa incluida en este estudio. En cuanto a la ST1817, como se indicó anteriormente, aparecen únicamente 10 genomas con serotipo O104:H7.

En la clasificación de Karmali *et al.* (2003) se le ha asignado el seropatotipo D al serotipo O117:HNM por aparecer únicamente implicado en cuadros clínicos moderados de diarrea. Este grupo clonal tiene poca presencia en España, donde aparece asociado al ganado ovino. Es importante destacar que en este estudio se asignan por primera vez las ST asociadas a este serotipo, y que la ST1817 la identificamos también en cepas O104:H7.

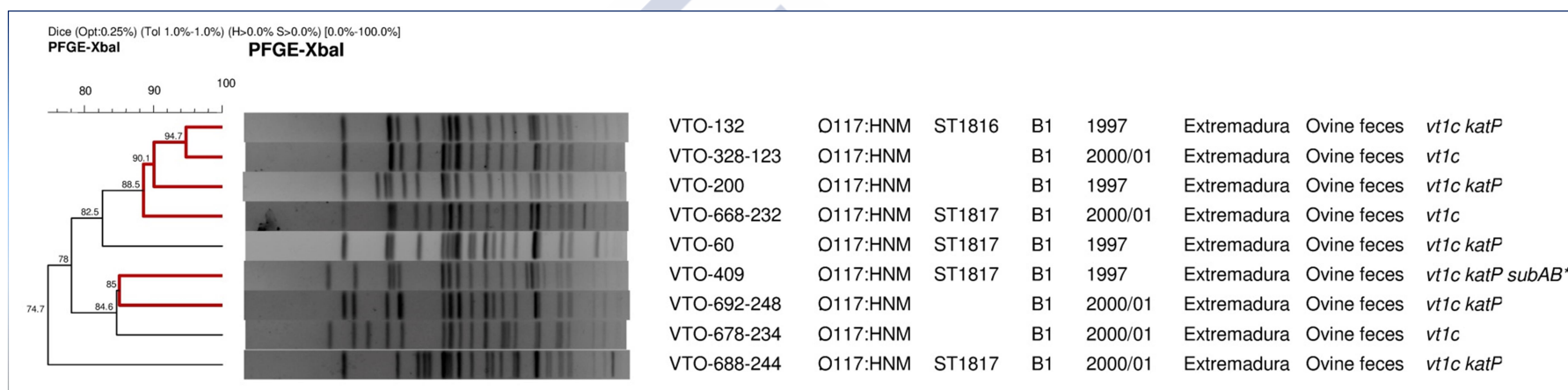


Figura 37. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 9 cepas ECVT O117:HNM. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. Los resultados positivos a la variante cromosómica de la subtilasa se indican como *subAB**

4.5.4.14. Grupo clonal O118:H16/HNM-B1-ST21

Se analizaron 13 cepas de ECVT del serogrupo O118 que mediante serotipado mostraron 2 serotipos (O118:H16 y O118:HNM). Ocho de las 13 cepas O118 eran de origen clínico humano, 4 de heces de ganado bovino y 1 de carne de vacuno. Todas ellas fueron aisladas en Lugo entre los años 1994 y 2007 (Tabla 19).

Dentro de este serogrupo se definió un único grupo clonal en base a su filogrupo y ST (O118:H16/HNM-B1-ST21), que en el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 13 cepas O118:H16/HNM (Figura 38) mostraron una identidad del 70%, con 3 clústeres de similitud >85%, uno de los cuales incluía 1 cepa de origen bovino y 1 cepa de origen clínico humano. En cuanto a los genes asociados a la virulencia, las 13 cepas fueron *vt1* (11 del subtipo *vt1a*; 2 cepas habían perdido el gen, por lo que no pudieron subtiparse), portadoras del gen *eae* (subtipo *eae-β1*) y del *iutA*; además, 10 de las 13 cepas eran portadoras de *E-hlyA*, *espP* y *katP*. Ninguna cepa O118:H16/HNM resultó positiva para los genes *vt2*, *subAB*, *stcE* o *saa*. El perfil de virulencia de nuestras cepas ECVT O118:H16/HNM es similar al descrito por otros autores para este serotipo (*vt1*, *eae*, *E-hlyA*, *espP*), independientemente del origen de aislamiento de las cepas o de la gravedad clínica del proceso en el caso de aislamientos humanos (Beutin *et al.* 2000c; Wieler *et al.* 2000).

Fenotípicamente las 13 cepas O118:H16/HNM de nuestra colección resultaron ser fermentadoras de sorbitol y positivas para la β-glucuronidasa. Las 13 crecieron en MACSTC y fueron positivas para los genes *terB/D* del clúster de resistencia al telurito (Tabla 27).

El grupo de ECVT O118 está reconocido como patógeno para el ganado vacuno; de hecho, este tipo de cepas se han aislado del ganado bovino sano y con diarrea en numerosos países del mundo, aunque con mayor prevalencia en Alemania y Bélgica (Mohammad *et al.* 1986; Wieler *et al.* 1998; Beutin *et al.* 2000c; Blanco *et al.* 2004c). Específicamente el serotipo O118:H16 se ha visto implicado en casos de SUH, CH y diarrea en humanos. Antes de 1996, el O118:H16 había sido detectado esporádicamente en cepas aisladas de casos clínicos humanos en Bélgica, Canadá y Reino Unido (Willshaw *et al.* 1992; Louie *et al.* 1994; Piérard *et al.* 1997a), pero entre 1996 y 1998 se describieron en Alemania 20 casos de pacientes infectados por ECVT O118 (17 de ellos O118:H16/HNM), en su mayoría infecciones ocurridas en entorno rural en los que el ganado bovino jugaba un papel fundamental en la transmisión (Beutin *et al.* 2000c). En dicho estudio quedó evidenciada la transmisión zoonótica en 2 casos, en base a los perfiles genéticos y de macrorrestricción de las cepas implicadas (Beutin *et al.* 2000c). Otros antígenos H asociados a las cepas ECVT O118 son H12 y H30, aunque este tipo de cepas se detectan con mucha menos frecuencia (Wieler *et al.* 2000).

En nuestro país, identificamos 2 cepas de ECVT O118:H16 entre 126 aisladas de 5.054 coprocultivos de pacientes del HULA en el estudio realizado entre 1992 y 1999 (Blanco *et al.*

2004) y 6 cepas entre las 391 cepas ECVT aisladas de 13.691 muestras analizadas aisladas en el mismo hospital entre los años 2003-2013 (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar) (cepas incluidas en este estudio). En cuanto a los reservorios, hemos aislado en España cepas ECVT O118:H16/HNM en ganado bovino (Blanco *et al.* 2004c), pero ninguna en diferentes estudios realizados de ganado ovino ni caprino (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003, 2008; Rey *et al.* 2003; Horcajo *et al.* 2010), ni de fauna silvestre (Mora *et al.* 2012a). En alimentos solo hemos aislado cepas de ECVT O118:H16 en carne picada de ternera, y en baja proporción: solo 1 aislamiento ECVT O118:H16 de 95 muestras positivas entre 785 de carne picada de vacuno, analizadas entre 1995-2003 (Mora *et al.* 2007a) (cepa incluida en este estudio) y ningún aislamiento positivo entre 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

En el presente estudio hemos identificado la ST21 en cepas ECVT O118:H16/HNM y O26:[H11]/HNM (Tabla 30). Cuando comparamos los perfiles de macrorrestricción de los 2 grupos ST21, observamos que las 13 cepas O118:H16/HNM-B1-ST21 se distribuían en el dendrograma con las cepas O26:[H11]/HNM-B1-ST21 formando 3 pequeños clústeres de identidad >85% que incluían cepas de ambos grupos (ver discusión en el apartado 4.6.2.1. Estructura y relaciones genéticas de la población de ECVT). Tanto el análisis comparativo de los perfiles de macrorrestricción, como los perfiles genéticos (todas las cepas O26 y O118 son *vt1a*, *eae-β1*, *iutA*) y filogenéticos, indicarían un origen clonal común con diversificación genética posterior derivada probablemente de eventos de recombinación.

Entre los 2.866 genomas ST21 que figuran en Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>) a fecha de diciembre de 2017, más de 2.500 se corresponden con cepas O26:H11, mientras que para el resto de genomas se predicen diferentes serotipos (O55:H16; O69:H11; O71:H11; O103:H11; O111:H11; O118 *or* O151:H16; O123 *or* O186:H11; *uncertain*:H11; *uncertain*:H16).

Aunque nosotros únicamente hemos aislado las cepas ECVT O118:H16 de casos clínicos de diarrea, las cepas O118:H16/HNM aparecen implicadas en procesos de SUH (Beutin *et al.* 2000c), por lo que según Karmali *et al.* (2003) se les asigna el seropatotipo C.

En resumen, nuestros resultados indican que el grupo clonal O118:H16/HNM está presente en el área sanitaria de Lugo. Demostramos que el ganado bovino juega un papel epidemiológico importante en el mantenimiento y transmisión de este patógeno al ser humano, dada la alta similitud encontrada entre los perfiles de macrorrestricción y virulencia de las cepas de ambos orígenes.

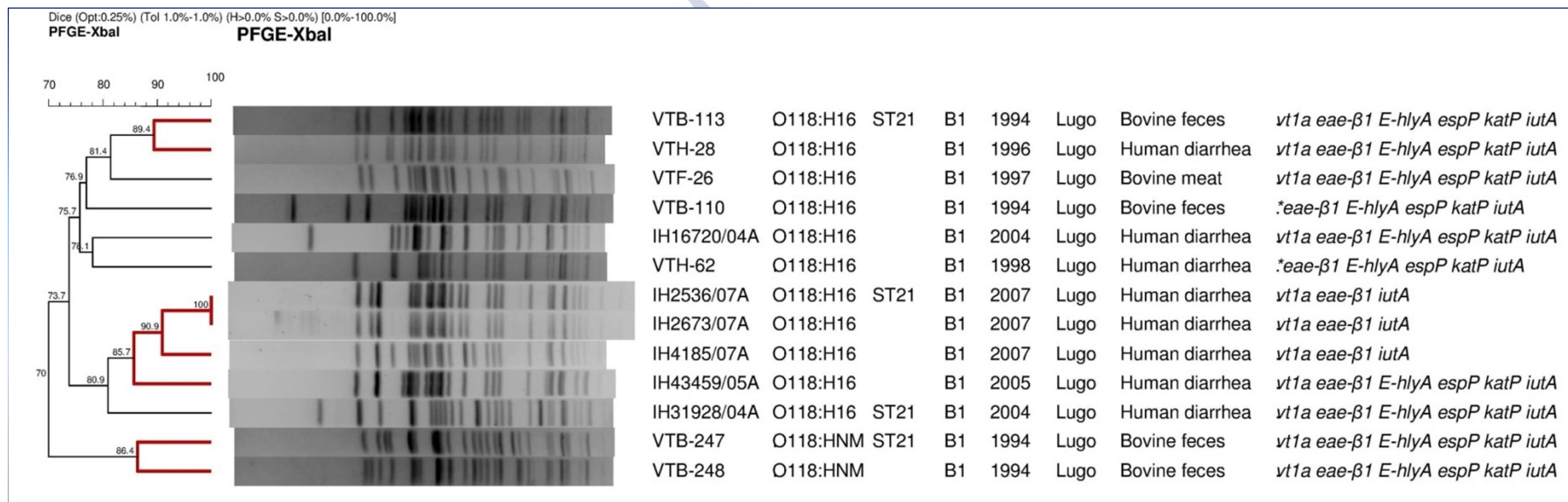


Figura 38. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 13 cepas ECVT O118:H16/HNM. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia.*Cepas originariamente *vt1* positivas

4.5.4.15. Grupo clonal O121:H19-B1-ST655

Se analizaron 2 cepas de ECVT del serotipo O121:H19, 1 de origen clínico humano y otra procedente de las heces de un corzo (Tabla 19), aisladas ambas en Lugo en los años 2004 y 2009, respectivamente.

Dentro de este serotipo se definió el grupo clonal O121:H19-B1-ST655 en base a su filogrupo y ST. Los perfiles de macrorrestricción de las cepas mostraron una similitud > 85% (Figura 39). En cuanto a los genes asociados a la virulencia, las 2 cepas fueron *vt2a* y *eae* (subtipo *eae-ε1*); adicionalmente, la cepa aislada de corzo fue positiva para los genes *E-hlyA* y *espP*, mientras que la cepa de origen clínico humano era portadora del gen *iutA*. Ninguna de las 2 cepas resultó positiva para los genes *vt1*, *katP*, *subAB*, *stcE* o *saa*. El perfil de genes de virulencia determinado para las 2 cepas ECVT O121:H19 de nuestro estudio coincide con el descrito por otros autores como típico de este serotipo: portadoras del subtipo *eae-ε1* y del subtipo de verotoxina *vt2a* (Shen *et al.* 2015).

Fenotípicamente las 2 cepas O121:H19 crecieron en MACSTC y resultaron positivas para los genes *terB/D* del cluster de resistencia al telurito, en concordancia con los resultados de las 19 cepas ECVT de este serotipo incluidas en el estudio de Tarr *et al.* (2002). Además, fueron fermentadoras de sorbitol y positivas para la β-glucuronidasa, al igual que observaron Seto *et al.* (2007) al analizar cepas aisladas de casos esporádicos de diarrea y CH (Tabla 27).

Las cepas ECVT del serogrupo O121 se han asociado a diferentes antígenos H (H9 y H10 en aislamientos de carne de cerdo; H7 en aislamientos de carne de jabalí; H11 en aislamientos de heces de bovino; H14 en aislamientos de carne de corzo) (Martin y Beutin, 2011; Beutin *et al.* 2015a) con diferentes marcadores de virulencia, pero solo las cepas del serotipo O121:H19 son portadoras de los genes *vt*, *eae* y se han asociado a brotes ocasionales y casos de CH y SUH (McCarthy *et al.* 2001; Beutin *et al.* 2004; Brooks *et al.* 2005; Beutin *et al.* 2015a), de manera que el grupo de ECVT O121:H19 está considerado como uno de los principales implicados en infecciones graves en seres humanos en diferentes lugares del mundo, como América del Norte y del Sur (McCarthy *et al.* 2001; Tarr *et al.* 2002), Japón (Seto *et al.* 2007; Hiroi *et al.* 2012; Kikuchi *et al.* 2014; Sakai *et al.* 2015), o en Europa (Beutin *et al.* 2004; Bugarel *et al.* 2010; Käppeli *et al.* 2011). De hecho, el serotipo O121:H19 junto con el O45:H2 están incluidos en Estados Unidos en el método de referencia estandarizado para la detección en alimentos de ECVT no O157 en ese país (USDA, 2014), junto a los 5 serotipos (O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H25/H28 y O157:H7) contemplados por el método europeo ISO/TS 13136 (EFSA, 2007).

En nuestro país, el ECVT O121 no es muy común, únicamente aislamos 1 cepa ECVT del serotipo O121:H19 (incluida en este estudio) en un caso clínico humano entre las 391 cepas ECVT aisladas de las 13.691 muestras analizadas entre los años 2003 y 2013 de pacientes del

HULA (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar), y no aislamos ninguna cepa de ECVT O121 entre las 5.054 muestras obtenidas de pacientes del mismo hospital en el estudio previo de los años 1992 y 1999 (Blanco *et al.* 2004). En cuanto a los reservorios, únicamente detectamos 1 cepa ECVT O121:H19 aislada de las heces de un corzo (la incluida en este estudio) entre las 701 muestras analizadas en fauna silvestre (incluido jabalíes, corzos y lobos) (Mora *et al.* 2012a). No se aisló ninguna cepa ECVT O121 en ganado bovino entre las 514 cepas ECVT analizadas en el estudio realizado por Blanco *et al.* (2004c), ni tampoco en el ganado ovino y caprino en distintos estudios (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Horcajo *et al.* 2010). Tampoco se aislaron cepas ECVT O121 en los estudios de alimentos, ni entre las 785 muestras de carne picada de ternera analizadas entre 1995 y 2003 (Mora *et al.* 2007a), ni entre las 1.253 muestras (carne de vacuno, carne de porcino, carne de ave, productos agrícolas y productos lácteos) analizadas entre 2009-2012 (Herrera, 2015).

Mellmann *et al.* (2008a) identificaron la ST655 en la única cepa O121:H19 que aislaron en un estudio en el que analizaron 524 cepas ECVT aisladas de pacientes con SUH entre 1996 y 2006. Recientemente, Fierz *et al.* (2017) también identificaron 1 cepa O121:H19-ST655 *vt2a eae-ε1 E-hlyA* entre los 95 aislamientos clínicos obtenidos entre 2010-214 en Suiza. Y en Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, figuraban 707 genomas ST655, todos asociados a O121:H19.

Aunque nosotros únicamente detectamos el serotipo O121:H19 en un caso clínico de diarrea, este serotipo está implicado en brotes ocasionales y es relativamente común en casos esporádicos de CH y SUH (McCarthy *et al.* 2001; Brooks *et al.* 2005) por lo que Karmali *et al.* (2003) le asignaron el seropatotipo B.

Como conclusión, las cepas del grupo ECVT O121:H19 presentan baja prevalencia, y una implicación clínica moderada en nuestra área sanitaria. Es importante señalar su presencia en fauna silvestre con las mismas características en cuanto a perfil de virulencia y perfil de macrorrestricción (>85% de identidad) que la cepa de origen clínico humano.

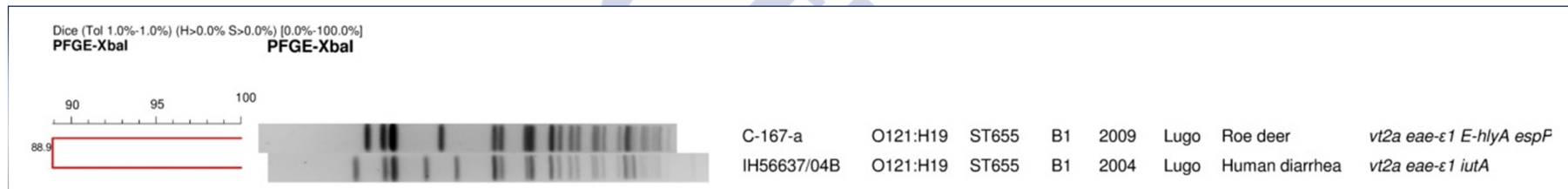


Figura 39. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 2 cepas ECVT O121:H19. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia

4.5.4.16. Grupo clonal O128:[H2]-B1-ST25

Se analizaron 31 cepas de ECVT del serotipo O128:[H2], 4 de origen clínico humano, 22 de heces de ganado ovino y 5 de ganado caprino, aisladas en diferentes puntos de la geografía española (Extremadura, Murcia, Lugo y Madrid) entre los años 1997 y 2007 (Tabla 19).

Se definió el grupo clonal O128:[H2]-B1-ST25) en base a su serotipo, filogrupo y ST. El dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 31 cepas O128:[H2] (Figura 40) mostró únicamente un 60,7% de similitud entre ellas; sin embargo, se formaron 7 clústeres (>85% de similitud), uno de los cuales incluía 2 cepas de origen clínico humano y 1 cepa de origen ovino.

En cuanto a los genes asociados a la virulencia, las 31 cepas eran portadoras del subtipo *vt1c* y la mayoría (29 cepas) portaban además la variante cromosómica del gen *subAB*; más de la mitad (18 cepas) eran *vt2* positivas del subtipo *vt2b* (1 cepa perdió el gen y no pudo subtiparse); 22 cepas fueron positivas para el gen *iutA*, 6 cepas positivas para el gen *EhlyA* y 1 cepa positiva para el gen *katP*. Ninguna cepa O128:[H2] fue positiva para *eae*, *espP*, para la variante plasmídica de *subAB*, *stcE*, o para el gen *saa*.

Fenotípicamente, 30 de las 31 cepas fueron fermentadoras de sorbitol (Tabla 27), en concordancia con lo observado en estudios previos en los que todas las cepas de este serotipo eran fermentadoras (Djordjevic *et al.* 2001; Zweifel *et al.* 2004). Además, 30 de las 31 cepas resultaron positivas para la beta-glucuronidasa. Únicamente 2 de las 31 cepas crecieron en MACSTC, las cuales fueron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27).

Según la revisión de Bettelheim (2007) se han detectado cepas ECVT del serogrupo O128 portadoras de los antígenos HNM, H2, H7, H8, H10, H12, H16, H19, H21, H35, H45 y HNT, siendo los serotipos predominantes el O128:HNM y O128:H2. En 1953, Taylor y Charter (1955) identificaron la primera cepa perteneciente al serogrupo O128, que fue aislada de varios casos de niños con diarrea en Reino Unido. Desde entonces, el ECVT O128:H2 está reconocido a nivel mundial como un ECVT no O157 importante, asociado con enfermedades humanas y en particular con el SUH (Johnson *et al.* 2006; Mellmann *et al.* 2008a). En un estudio realizado por Beutin *et al.* (2004) detectaron el ECVT O128:H2 en 23 de las 677 cepas ECVT de aislados clínicos humanos en un estudio realizado en Alemania entre los años 1997 y 1999. Brett *et al.* (2003) también detectaron el ECVT O128:H2 en 6 cepas aisladas de diarrea en humanos entre las 45 cepas ECVT aisladas de diferentes procesos clínicos humanos (portadores asintomáticos, diarrea y SUH). Posteriormente, en el año 2010, el ECVT O128:H2 se detectó en un caso de diarrea asociada a SUH complicada con bacteriemia en Bélgica (Buvens *et al.* 2013). Y, entre los años 2004 y 2011, se aisló el ECVT O128 de un paciente con SUH entre los 12.587 ECVT aislados de pacientes en Alemania (Preußel *et al.* (2013).

En España, únicamente hemos detectado 1 cepa ECVT O128 entre las 126 ECVT aisladas de las 5.054 muestras de origen humano analizadas en un estudio realizado entre los años 1992 y 1999 (Blanco *et al.* 2004), junto con 3 cepas obtenidas entre las 391 ECVT de las 13.691 muestras analizadas de pacientes del HULA entre los años 2003 y 2013 (LREC datos sin publicar) (las 4 cepas incluidas en este estudio). En cuanto a los reservorios, detectamos en ganado bovino 4 cepas O128:HNM entre las 514 cepas ECVT aisladas en un estudio realizado por Blanco *et al.* (2004c). Con mayor prevalencia identificamos el serotipo O128:H2 en ganado ovino, concretamente en 14 de las 384 cepas ECVT aisladas de 1.300 muestras de heces de un estudio realizado en el año 1997 por Blanco *et al.* (2003b), en el que se detectaron además los serotipos O128:HNM, O128:H8, O128:H10 y O128:H21; asimismo en otro estudio en ganado ovino determinamos los serotipos O128:HNM, O128:H2 y O128:H16 (Orden *et al.* 2003; Horcajo *et al.* 2010). También en ganado caprino determinamos los serotipos O128:HNM, O128:H2, junto con el O128:H19 (Orden *et al.* 2003; Horcajo *et al.* 2010) (cepas representativas de los citados estudios en ovino y caprino están incluidas en esta colección). Es importante señalar que también hemos aislado ECVT O128:H2 en fauna silvestre, concretamente 1 cepa de las heces de jabalí en un estudio realizado en Galicia entre los años 2009 y 2010 en el que se analizaron 701 muestras (incluidas muestras de heces de corzo, jabalí y lobo) (Mora *et al.* 2012a). Otros estudios también han reportado aislamientos de ECVT O128:H2 de fauna silvestre, concretamente en ciervo (Sánchez *et al.* 2013) y en muflón (Alonso *et al.* 2016). En cuanto a los alimentos, solo hemos aislado 2 cepas de ECVT O128 portadoras de los antígenos H31 y H21 en carne picada de ternera entre las 149 cepas ECVT aisladas en la ciudad de Lugo, analizadas entre 1995-2009 (Mora *et al.* 2007a; Herrera, 2015) y ningún aislamiento positivo entre 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

A nivel mundial, el ECVT O128:H2 se ha aislado principalmente en ganado ovino en diferentes países, y raramente del ganado bovino (Beutin *et al.* 1993, 1995, 1997a; Ramachandran *et al.* 2001; Djordjevic *et al.* 2001; Hornitzky *et al.* 2002; Brett *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003; Zweifel *et al.* 2004; Bettelheim 2007; Vettorato *et al.* 2009). Djordjevic *et al.* (2004) sugirieron que el serotipo O128:H2 es uno de los serotipos bien adaptado para colonizar el tracto gastrointestinal ovino, siendo también uno de los serotipos predominantes en las heces de ganado ovino en Australia (Djordjevic *et al.* 2004). En Alemania se han aislado cepas de ECVT O128:H2 en carne de caza (ciervo y liebre) (Miko *et al.* 2009; Martin y Beutin, 2011), además de en productos cárnicos y lácteos de origen ovino y caprino (Martin y Beutin, 2011).

Todas las cepas O128:H2 de nuestra colección eran portadoras del subtipo *vt1c*, asociado principalmente al ganado ovino (Koch *et al.* 2001; Ramachandran *et al.* 2001; Urdahl *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2002a; Friedrich *et al.* 2003; Brett *et al.* 2003; Horcajo *et al.* 2010). Además, 15 de las 31 cepas ECVT O128:H2 de nuestra colección fueron positivas para los genes *vt1c* *vt2b*, combinación asimismo frecuentemente detectada en cepas de ECVT aisladas de pequeños rumiantes, domésticos o silvestres (Martin y Beutin 2011; Sánchez *et al.* 2012).

Veintinueve de las 31 cepas O128:H2 de nuestra colección fueron positivas para la variante cromosómica de la subtilasa (*subAB₂*) típicamente asociada a las cepas ECVT O128:H2, como se recoge en los estudios de Orden *et al.* (2011), Sánchez *et al.* (2012, 2013), o Michelacci *et al.* (2013) para cepas de origen humano, ovino, caprino y rumiantes silvestres.

La ST25 aparece en la literatura científica asociada a cepas ECVT O128:H2 (Mellmann *et al.* 2008a; Sánchez *et al.* 2012), pero también a otros serotipos como el O45:H2 (Bai *et al.* 2016). En Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, figuran 85 genomas en los que se predice principalmente el serotipo O128:H2 o O128/OX38:H2.

Aunque nosotros únicamente hemos detectado cepas O128:[H2] aisladas de pacientes con diarrea, este serotipo se ha asociado a casos de SUH en humanos en diversas partes del mundo (Johnson *et al.* 2006; Mellmann *et al.* 2008a) por lo que según la clasificación de Karmali *et al.* (2003) se le asigna el seropatotipo C.

En resumen, en base a nuestros resultados, este grupo clonal tendría como principal reservorio a los pequeños rumiantes, que pueden jugar un papel epidemiológico importante en el mantenimiento y transmisión de este patógeno al hombre, dada la alta similitud en los perfiles de macrorrestricción y virulencia que encontramos entre las cepas de origen clínico humano y animal de nuestra colección.



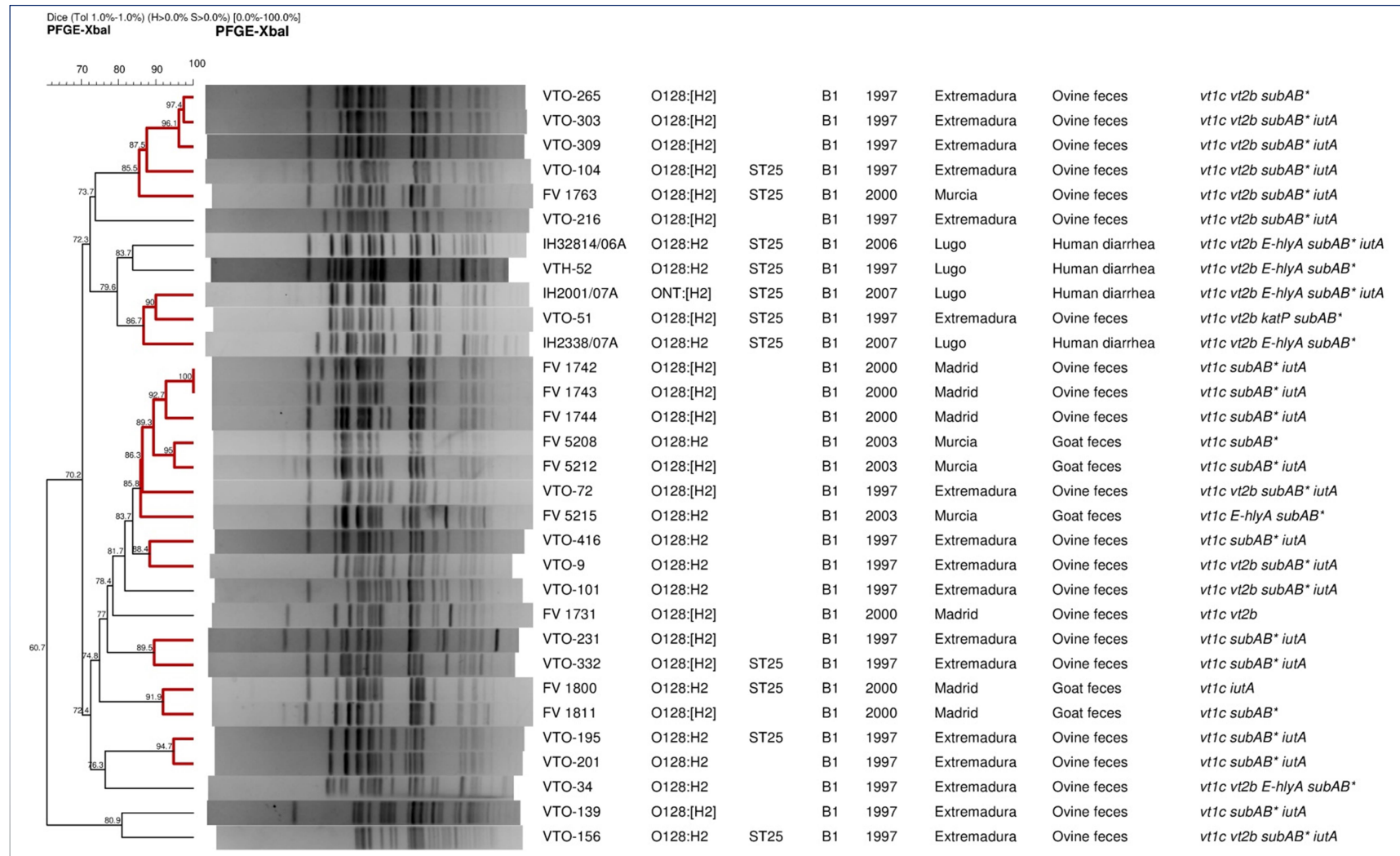


Figura 40. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 31 cepas ECVT O128:H2. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. Los resultados positivos a la variante cromosómica de la subtilasa se indican como *subAB**

4.5.4.17. Grupo clonal O145:[H28]-E-ST32

En el presente estudio se analizaron 8 cepas de ECVT del serotipo O145:[H28], 6 de origen clínico humano, 1 de carne de vacuno y 1 obtenida de las heces de un corzo (Tabla 19). Estas cepas se aislaron entre los años 1999 y 2009 en Lugo y A Coruña.

Dentro de este serotipo se definió el grupo clonal O145:[H28]-E-ST32 en base a su serotipo, filogrupo y ST. En el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción, las 8 cepas mostraron únicamente un 67,4% de similitud entre ellas, con 2 pequeños clústeres (>85% de similitud), en los que se agrupaban cepas de distintos orígenes (Figura 41). En cuanto a los perfiles de virulencia, 5 de las 8 cepas fueron *vt1* (del subtipo *vt1a*), 4 *vt2* (3 del subtipo *vt2a*) y 1 *vt1a* y *vt2d*, es decir, todas las cepas de este serotipo eran portadoras de uno o varios de los subtipos de verotoxinas asociados a los síntomas clínicos más graves en humanos (*vt1a*, *vt2a* y *vt2d*) (Friedrich *et al.* 2003; Jelacic *et al.* 2003; Bielaszewska *et al.* 2013). Todas las cepas eran portadoras del gen *eae-γ1*, 6 positivas para el gen *E-hlyA*, 5 *espP*, 3 *katP* y 5 *iutA* positivas. Ninguna cepa O145:[H28] resultó positiva para los genes *subAB*, *stcE*, *saa*. Fenotípicamente las 8 cepas eran fermentadoras de sorbitol y positivas para la β-glucuronidasa. Además, las 8 cepas crecieron en MACSTC y fueron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27).

El O145 ya fue descrito por Karmali *et al.* (1985) entre los primeros serogrupos detectados en pacientes con SUH, y sigue estando implicado en este tipo de casos (Pérez *et al.* 2014). De hecho, los ECVT O145 son importantes patógenos responsables de casos esporádicos y brotes de SUH y CH en EE.UU. y en todo el mundo (Karmali *et al.* 1985; Gerber *et al.* 2002; Brooks *et al.* 2005; Johnson *et al.* 2006; Yan *et al.* 2012; Taylor *et al.* 2013; Smith *et al.* 2014). Además, los ECVT O145 se han convertido en uno de los grupos “no O157” más importantes asociados con diarrea y SUH en Europa (Bielaszewska y Karch 2000; Eklund *et al.* 2001; Friedrich *et al.* 2002; Fruth *et al.* 2002; Gerber *et al.* 2002; Tozzi *et al.* 2003; Beutin *et al.* 2015b). Sonntag *et al.* (2004) encontraron 2 serotipos distintos asociados a las cepas ECVT O145, el O145:H25 y el O145:HNM/H28. Pero mientras que la mayoría de los aislados clínicos de O145 descritos en la literatura son cepas móviles y no móviles del serotipo O145:H28, los ECVT O145:H25 se describen con menor prevalencia. Sin embargo, la mayoría de los aislados de EHEC O145:H25 documentados están asociados con SUH, lo que enfatiza la importancia de este serotipo en particular (Eklund *et al.* 2001; Sonntag *et al.* 2004; Käppeli *et al.* 2011; Carter *et al.* 2015). En cuanto a los reservorios, las cepas ECVT O145:H28/HNM parecen asociadas principalmente al ganado bovino (Blanco *et al.* 2004b; Monaghan *et al.* 2011; Bibbal *et al.* 2015). Hay estudios que demuestran la transmisión animal-persona; ejemplo de ello, es el estudio realizado por Heinikainen *et al.* (2007) en el que aislaron el ECVT O145:H28 *vt1*, *eae-γ1*, *E-hlyA* en un niño y en su madre en Finlandia y también aislaron la cepa del ganado vacuno de la casa familiar. También se ha demostrado la transmisión de este patógeno al hombre a través de los alimentos, ejemplo de ello, es el brote

que tuvo lugar el año 2007 en Bélgica provocado por un ECVT O145:H28 y un O26:H11; 5 niños desarrollaron el SUH y otras 7 personas se vieron afectadas con diarrea sanguinolenta. El O145:H28 fue detectado en 3 pacientes con SUH, 1 de ellos coinfectado con el O26:H11. El helado fabricado con leche pasteurizada de una granja local parece ser la causa más probable del brote. Se aislaron ECVT de ambos serotipos con patrones indistinguibles de PFGE de pacientes, del helado y de muestras ambientales (Buvens *et al.* 2011).

En España, hemos detectado cepas ECVT del serogrupo O145 portadoras de los antígenos H28 (1 cepa) y HNM (2 cepas) de origen humano en un estudio llevado a cabo entre los años 1992 y 1999 entre las 126 cepas ECVT aisladas de 5.054 muestras de pacientes analizadas (Blanco *et al.* 2004). Posteriormente, entre los años 2003 y 2013 se observó que el serotipo O145:HNM se encontraba entre los más frecuentemente en cepas ECVT aisladas en casos clínicos humanos en Lugo (Mora *et al.* 2011; LREC datos sin publicar) (en este estudio se incluyen cepas representativas de ambos periodos). En cuanto a los reservorios, no detectamos cepas O145 entre 514 cepas ECVT aisladas de ganado bovino con diarrea y sano (Blanco *et al.* 2004c). Tampoco detectamos cepas ECVT O145 en nuestros estudios de ovino y caprino (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003, 2008; Rey *et al.* 2003). En fauna silvestre únicamente aislamos 1 cepa ECVT O145:H28 de las heces de un corzo (incluida en la presente colección) en un estudio realizado en Galicia entre los años 2009 y 2010 en el que se analizaron 701 muestras (incluidas muestras de heces de corzo, jabalí y lobo) (Mora *et al.* 2012a). En alimentos solo hemos obtenido 1 aislamiento ECVT O145:HNM (incluido en este estudio) de 95 muestras ECVT positivas entre 785 de carne picada de vacuno, analizadas entre 1995-2003 (Mora *et al.* 2007a) y únicamente aislamos 1 cepa ECVT O145:H35 en una lechuga entre 1.253 muestras analizadas entre 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

La ST32 aparece en la literatura científica asociada a cepas ECVT O145:H28 (Mellmann *et al.* 2008a; Marejková *et al.* 2013; Fierz *et al.* 2017). En Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, figuran 464 genomas ST32 en los que curiosamente, se predice mayoritariamente el O145, pero solo en 8 genomas se predice el antígeno H28; para el resto figura un antígeno H incierto “*uncertain*”.

Al serotipo O145:H28 se le ha asignado el seropatotipo B de la clasificación de Karmali *et al.* (2003) puesto que no produce brotes con mucha frecuencia (Sonntag *et al.* 2004; Buvens *et al.* 2011); en nuestro caso, todas las cepas estaban asociadas a casos moderados de diarrea.

Por tanto, el grupo clonal O145:[H28]-E-ST32 está implicado en casos clínicos de nuestra área sanitaria. Es importante destacar su presencia en fauna silvestre, y dada la alta similitud encontrada entre los perfiles de macrorrestricción y virulencia de una cepa de origen clínico humano y un aislamiento de un ciervo, estos animales podrían actuar como potenciales transmisores. Corroboramos asimismo la carne de vacuno como vehículo transmisor de cepas altamente similares a las que producen patología en el hombre.



Figura 41. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 8 cepas ECVT O145:[H28]. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia

4.5.4.18. Grupos clonales O156:[H10]-B1-ST441 y O156:[H25]-B1-ST300

Se analizaron 22 cepas de ECVT del serogrupo O156 entre las que se determinaron 2 serotipos mediante serotipado y PCR: 17 cepas O156:[H25] y 5 cepas O156:[H10]. Tres de las 22 cepas O156 eran de origen clínico humano, 10 de heces de ganado ovino y 9 de heces de ganado bovino, aisladas en Lugo y Extremadura (Tabla 19).

Se definieron 2 grupos clonales en base al serotipo, filogrupo y ST: O156:[H10]-B1-ST441 y O156:[H25]-B1-ST300. En el dendrograma generado del análisis de los perfiles de macrorrestricción (Figura 42), las 22 cepas quedaron distribuidas en 2 grupos (A y B) de tan solo un 54,6% de similitud global entre ellas.

En el Grupo A se incluyeron las 5 cepas O156:[H10]-B1-ST441, aisladas de heces de ganado bovino en Lugo en el año 1995, que presentaron una identidad de tan solo el 69,4%, con un pequeño clúster de 2 cepas ($\geq 85\%$ de similitud) (Figura 42). Todas las cepas eran portadoras del gen *vt2*, 2 del subtipo *vt2a*, 1 *vt2a* y *vt2d* (2 cepas perdieron el gen, por lo que no pudieron subtiparse); además, todas las cepas eran portadoras del gen *espP*. Ninguna cepa O156:[H10] resultó positiva para los genes *vt1*, *eae*, *E-hlyA*, *iutA*, *subAB*, *stcE*, *saa*.

En el Grupo B quedaron incluidas las 17 cepas O156:[H25]-B1-ST300, 10 aisladas de heces de ganado ovino de Extremadura entre los años 1997 y 2001, y las otras 7 se aislaron en Lugo entre los años 1997 y 2003 (4 de heces de ganado bovino y 3 de casos clínicos humanos) (Figura 42). Las 17 cepas de este grupo presentaron una similitud en sus perfiles de macrorrestricción del 75,3%, con 3 clústeres que agrupaban 9, 2 y 3 cepas, respectivamente; destaca el clúster de 3 cepas por agrupar 2 de origen clínico humano y 1 aislamiento de heces de bovino. En cuanto al perfil de virulencia de este grupo clonal, las 17 cepas fueron portadoras de los genes *eae- ζ* , *E-hlyA* y la mayoría (15 cepas) también de *stcE*. Todas las cepas de origen ovino eran portadoras del subtipo *vt1c*, en concordancia con su asociación a dicho origen según estudios previos (Brett *et al.* 2003; Urdahl *et al.* 2003). Sin embargo, 6 de las 7 cepas de origen humano y bovino eran portadoras del subtipo *vt1a*; el perfil de virulencia de estas 6 cepas (*vt1a*, *eae- ζ* , *E-hlyA*, *espP*) coincide con el descrito previamente por Geue *et al.* (2010) en cepas ECVT del serotipo O156:H25 aisladas de terneros. Ninguna cepa O156:[H25] resultó positiva para los genes *katP*, *subAB*, *saa*, *iutA*.

Fenotípicamente, las 22 cepas de ECVT O156 de nuestro estudio resultaron positivas para la β -glucuronidasa, y 17 eran fermentadoras de sorbitol. Además, solo 8 cepas presentaron crecimiento en MACSTC, aunque 15 resultaron positivas para los genes *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27).

Según la revisión de Bettelheim (2007), el serogrupo O156 está implicado en infecciones humanas y se ha aislado de diferentes orígenes, como por ejemplo, de terneros sanos y

enfermos, de ganado ovino y caprino, y de alimentos. En el caso de infecciones humanas, se han visto implicadas cepas ECVT de los serotipos O156:H1/H8/H21/H25 (Lehmacher *et al.* 1998; Eklund *et al.* 2001, 2002; Creuzburg *et al.* 2007; Bielaszewska *et al.* 2008; Fierz *et al.* 2017). En el caso de los rumiantes domésticos, se han descrito en todo el mundo cepas O156:H7/H8/H25/HNM (Sandhu *et al.* 1996; Aktan *et al.* 2004; Cortés *et al.* 2005; Creuzburg *et al.* 2007; Diarra *et al.* 2009; Manna *et al.* 2010; Mekata *et al.* 2014).

En España, el ECVT O156 fue identificado por nuestro grupo en pacientes del HULA en un estudio realizado entre los años 1992 y 1999 (Blanco *et al.* 2004), en el que se aisló 1 cepa ECVT O156:HNM (incluida en este estudio) y otra O156:H4 entre las 5.054 muestras analizadas. En un segundo estudio realizado en este mismo hospital entre los años 2003 y 2013, se aislaron 3 cepas ECVT del serotipo O156:[H25] (2 incluidas en este estudio) entre las 391 cepas ECVT obtenidas de 13.691 muestras (LREC datos sin publicar). En cuanto a los reservorios, en un estudio realizado por nuestro grupo en el año 1997 en el que se analizaron 1.300 muestras de heces de ganado ovino, detectamos el serogrupo O156 portador de los antígenos HNM, H11 y H25 en 13, 1 y 2 cepas, respectivamente (Blanco *et al.* 2003b). También en ovino, en 697 muestras obtenidas entre 2000 y 2001, detectamos 2 cepas O156:HNM de las 253 cepas ECVT aisladas (Rey *et al.* 2003) (cepas representativas de ambos estudios incluidas en esta colección). En ganado caprino sano, Orden *et al.* (2003) detectaron el serotipo O156:H25 en 1 cepa aislada de 253 muestras. En ganado bovino, nuestro grupo identificó el ECVT O156 portador de los antígenos HNM, H19 y H25 en 9, 1 y 1 cepas respectivamente en un estudio en el que se analizaron 514 cepas ECVT de este origen (Blanco *et al.* 2004c). En fauna silvestre no detectamos el ECVT O156 en las 701 muestras analizadas (incluido jabalíes, corzos y lobos) en un estudio realizado en Galicia entre los años 2009 y 2010 (Mora *et al.* 2012a) y tampoco lo detectaron Sánchez *et al.* (2009a) entre las 243 muestras de animales abatidos en cacerías (incluidos corzo, ciervo, gamo y muflón) que analizaron en un estudio llevado a cabo en Extremadura entre los años 2004 y 2005. En alimentos únicamente aislamos 1 cepa O156:H8 entre las 149 cepas ECVT aisladas de carne de vacuno en la ciudad de Lugo entre los años 1995 y 2009 (Mora *et al.* 2007a; Herrera, 2015); y en el segundo estudio realizado entre los años 2009-2012 aislamos otra cepa ECVT O156:H25 de carne picada de vacuno entre las 1.253 muestras analizadas, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

La ST300 aparece referenciada en el estudio de Geue *et al.* (2017), y otras publicaciones previas del mismo grupo, asociada a cepas ECVT de los serotipos O182:H25 y O156:H25. En ese mismo estudio se identifica también la ST688 (un SNP de diferencia en *purA* con respecto a la ST300) en algunas cepas ECVT O156:H25. En el trabajo de Fierz *et al.* (2017) se identifican además otras 2 SLV de la ST300 para 2 cepas ECVT O156:[H25] *vt1a eae E-hlyA* aisladas de pacientes humanos, la ST4942 y la ST5343. Sin embargo, no se encuentran referencias publicadas de la ST441, ni de ECVT O156:H10. En Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>), a fecha de diciembre de 2017, se relacionan 78

genomas ST300 asociados a O156:H25 y O182:H25, y 13 genomas ST441 en los que se predice únicamente el antígeno H10.

En la clasificación de Karmali *et al.* (2003) al serotipo O156:[H25] se le ha asignado el seropatotipo C por estar asociado con diarrea sanguinolenta (Eklund *et al.* 2002); sin embargo, al serotipo O156:[H10], implicado en cuadros moderados de diarrea, se le ha asignado el seropatotipo D.

En resumen, de acuerdo con nuestros resultados, el grupo clonal O156:[H25]-B1-ST300 tendría en el ganado ovino y bovino sus principales reservorios, destacando la alta similitud en perfiles de virulencia y de macrorrestricción encontrados entre las cepas de origen humano y bovino aisladas en nuestra área sanitaria. En el caso del grupo clonal O156:[H10]-B1-ST441, sería el ganado bovino su reservorio, en base a las cepas caracterizadas en este estudio y a falta de referencias publicadas en relación a la ST441 o al serotipo O156:H10.



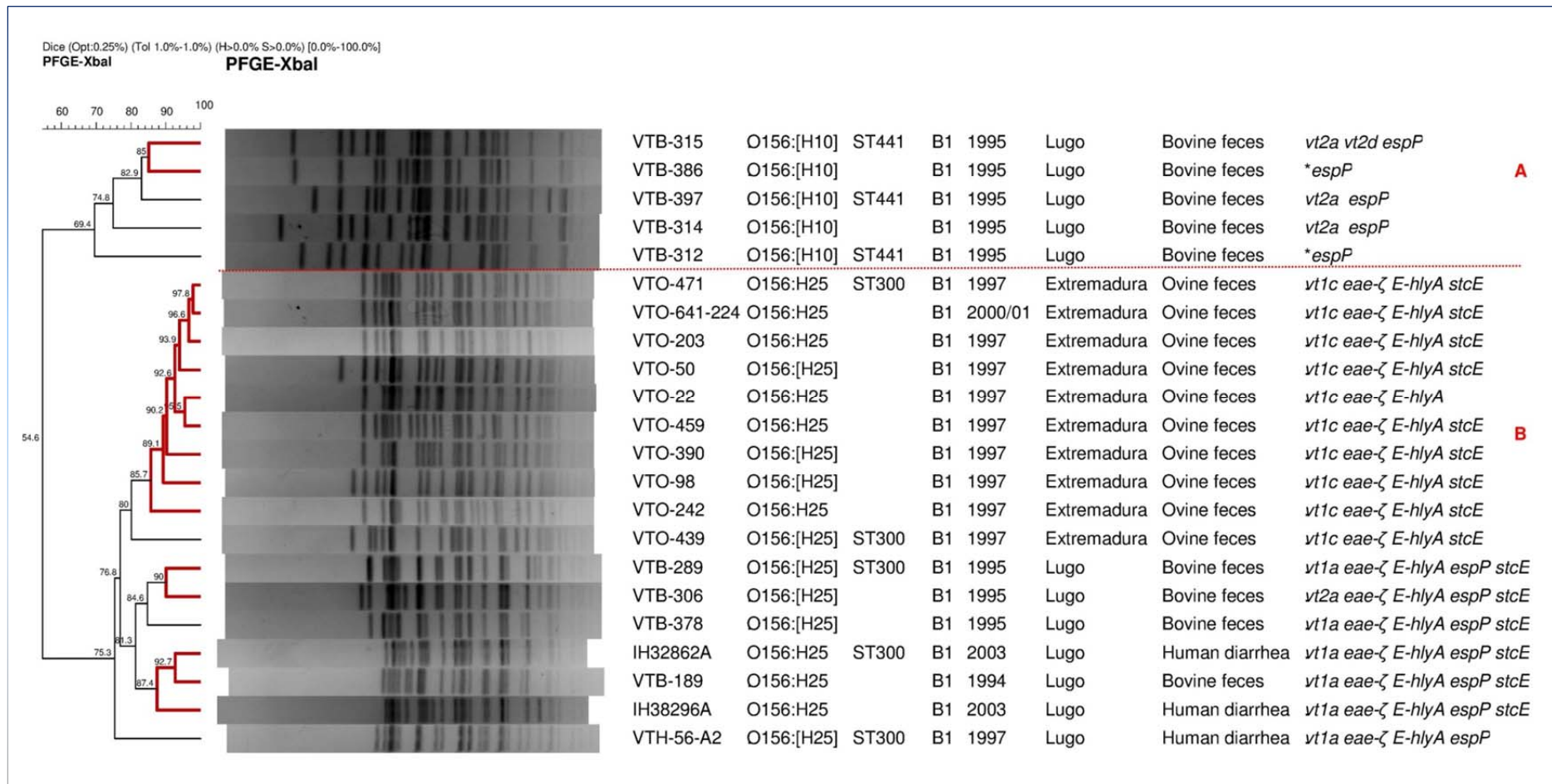


Figura 42. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 22 cepas ECVT O156. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogrupo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. *Cepas originariamente positivas para el gen *vt2*

4.5.4.19. Grupo clonal O166:H28-E-ST1819/ST1824

En el presente estudio se incluyeron 43 cepas de ECVT del serotipo O166:H28, 3 de origen clínico humano, 10 de heces de ganado caprino, 1 de heces de ganado caprino con diarrea, 19 de heces de ganado ovino, 8 de leche de ganado ovino, 1 de heces de ganado bovino y 1 de carne de vacuno, aisladas en diferentes zonas geográficas españolas (Extremadura, Madrid, Murcia, León, Lugo, y Zamora) entre los años 1995 y 2004 (Tabla 19).

Dentro de este serotipo se definió el grupo clonal O166:H28-E-ST1819/ST1824 en base al serotipo, filogrupo y ST, puesto que las ST1819 y ST1824 constituyen SLV con una única diferencia alélica en el gen *purA* (Tabla 30) (ver también discusión en el apartado 4.6.2.1. Estructura y relaciones genéticas de la población de ECVT). El análisis de los perfiles de macrorrestricción de las 43 cepas determinó una identidad global del 72,1%, con 8 clústeres de similitud >85% (Clústeres I a VIII, Figura 43). En 4 de los 8 clústeres se incluyeron cepas de distintos orígenes (Clústeres III, V, VI y VIII); destacan especialmente el clúster III con 3 cepas de origen clínico humano, ovino y caprino, y el clúster VI con 2 cepas de origen clínico humano y bovino.

El análisis de los perfiles de virulencia de las 43 cepas ECVT O166:H28 mostró que la mayoría (40) eran *vt1* del subtipo *vt1c* (1 cepa perdió el gen, por lo que no pudo ser subtipada), y más de la mitad (24) eran además *vt2* del subtipo *vt2b* (1 cepa perdió el gen, por lo que tampoco pudo subtiparse). También característico del perfil de virulencia de estas cepas es la presencia de los genes *E-hlyA* (34 cepas) y de la subtilasa cromosómica (32 positivas; 4 cepas no pudieron ser analizadas para este gen). Adicionalmente, 11 cepas eran positivas para *iutA*. Ninguna resultó positiva para los genes *eae*, *espP*, *katP*, *stcE*, *saa*, ni para la variante plasmídica de la subtilasa. Fenotípicamente, las 43 cepas resultaron ser fermentadoras de sorbitol y positivas para la β -glucuronidasa; además, 19 de las 43 crecieron en MACSTC y fueron positivas para *terB/D* de resistencia al telurito (Tabla 27).

Según la revisión Bettelheim de 2007, el O166 quedó incluido entre los serogrupos descritos menos de 30 veces entre las cepas ECVT, que se asociaría principalmente a aislados clínicos humanos y de origen ovino. Sin embargo, numerosas referencias posteriores reportan aislamientos de ECVT de los serotipos O166:H8/H25/H28/HNM en infecciones humanas en Bélgica y Suiza (Buvens *et al.* 2012; Fierz *et al.* 2017); aislamientos O166:H28/HNM en fauna silvestre (Sánchez *et al.* 2013) y de origen caprino O166:H28 en España (Orden *et al.* 2016; Álvarez-Suárez *et al.* 2016); así como aislamientos O166:H28 de alimentos de distintos orígenes, como carne de vacuno y carne/leche de ganado ovino/caprino en Alemania (Martin y Beutin, 2011), o queso en Francia (Madic *et al.* 2011); entre otras referencias.

Concretamente en España, el ECVT O166 fue identificado por nuestro grupo en pacientes del HULA en un estudio realizado entre los años 1992 y 1999 (Blanco *et al.* 2004), en

el que se aislaron 2 cepas O166:H28 entre las 5.054 muestras analizadas (incluidas en esta colección). En un segundo estudio realizado en este mismo hospital entre los años 2003 y 2013, detectamos otras 2 cepas O166:H28 entre las 391 cepas ECVT de las 13.691 muestras analizadas (LREC datos sin publicar) (una de esas cepas está incluida en esta colección). En cuanto a los reservorios, en diferentes estudios se han identificado como portadores, fundamentalmente de cepas del serotipo O166:H28, al ganado ovino (Blanco *et al.* 2003b; Orden *et al.* 2003; Rey *et al.* 2003), al ganado caprino (Orden *et al.* 2003, 2008; Cortés *et al.* 2005) y al ganado vacuno (Blanco *et al.* 2004c) (incluidas cepas representativas de dichos estudios en esta colección). En fauna silvestre, el ECVT del serogrupo O166 fue detectado en 4 cepas aisladas de las 243 muestras analizadas en un estudio en Extremadura entre los años 2004 y 2005 en animales abatidos en cacerías (incluidos corzo, ciervo, gamo y muflón) (Sánchez *et al.* 2009a); sin embargo, no se recuperó ninguna cepa ECVT O166 en las 701 muestras analizadas de animales abatidos en cacerías (incluido jabalíes, corzos y lobos) en un estudio realizado en Galicia entre los años 2009 y 2010 (Mora *et al.* 2012a). Únicamente detectamos 1 cepa O166:H28 entre las 149 ECVT aisladas de carne de vacuno en la ciudad de Lugo entre los años 1995 y 2009 (Mora *et al.* 2007a; Herrera, 2015); y otras 2 cepas O166:H28 obtenidas de carne picada de porcino y de productos lácteos entre 1.253 muestras analizadas entre los años 2009-2012, incluyendo carne picada de vacuno, de cerdo, de ave, productos agrícolas y lácteos (Herrera, 2015).

Las cepas ECVT O166:H28 de nuestro estudio presentaron un perfil de virulencia típicamente *vt1c* (*vt2b*), *E-hlyA*, *subAB* (variante cromosómica), en concordancia con lo reportado para este serotipo en aislamientos humanos (Fierz *et al.* 2017), ovinos, caprinos (Orden *et al.* 2016) y de fauna silvestre (Sánchez *et al.* 2013).

Las ST1819 y ST1824 identificadas asociadas a este grupo clonal fueron asignadas por primera vez en la base de datos de MLST a las cepas del presente estudio (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>). La ST1819 aparece además referenciada en el trabajo de Fierz *et al.* (2017) para un aislamiento clínico humano *vt1c*, *E-hlyA*, *subAB*_{2,2}. En Enterobase, a fecha de diciembre de 2017, figuran 18 genomas ST1819 en los que se predice O166:H28; en cuanto a la ST1824, no hay ningún genoma asociado.

Según la clasificación de Karmali *et al.* (2003), al serotipo O166:H28 se le ha asignado el seropatotipo D, ya que no está asociado ni a enfermedades graves ni a brotes.

En resumen, el grupo clonal O166:H28-E-ST1819/ST1824, presente en diferentes puntos de la geografía española, tiene como principales reservorios al ganado ovino y caprino, pero también está presente en el bovino. Estos portadores juegan un papel epidemiológico importante en el mantenimiento y transmisión de este patógeno al hombre, dada la alta similitud encontrada entre los perfiles de macrorrestricción y virulencia de las cepas de origen clínico humano y animal. Además, es importante destacar que en este estudio se asignaron por primera vez 2 ST asociadas al serotipo O166:H28 (ST1819 y ST1824).

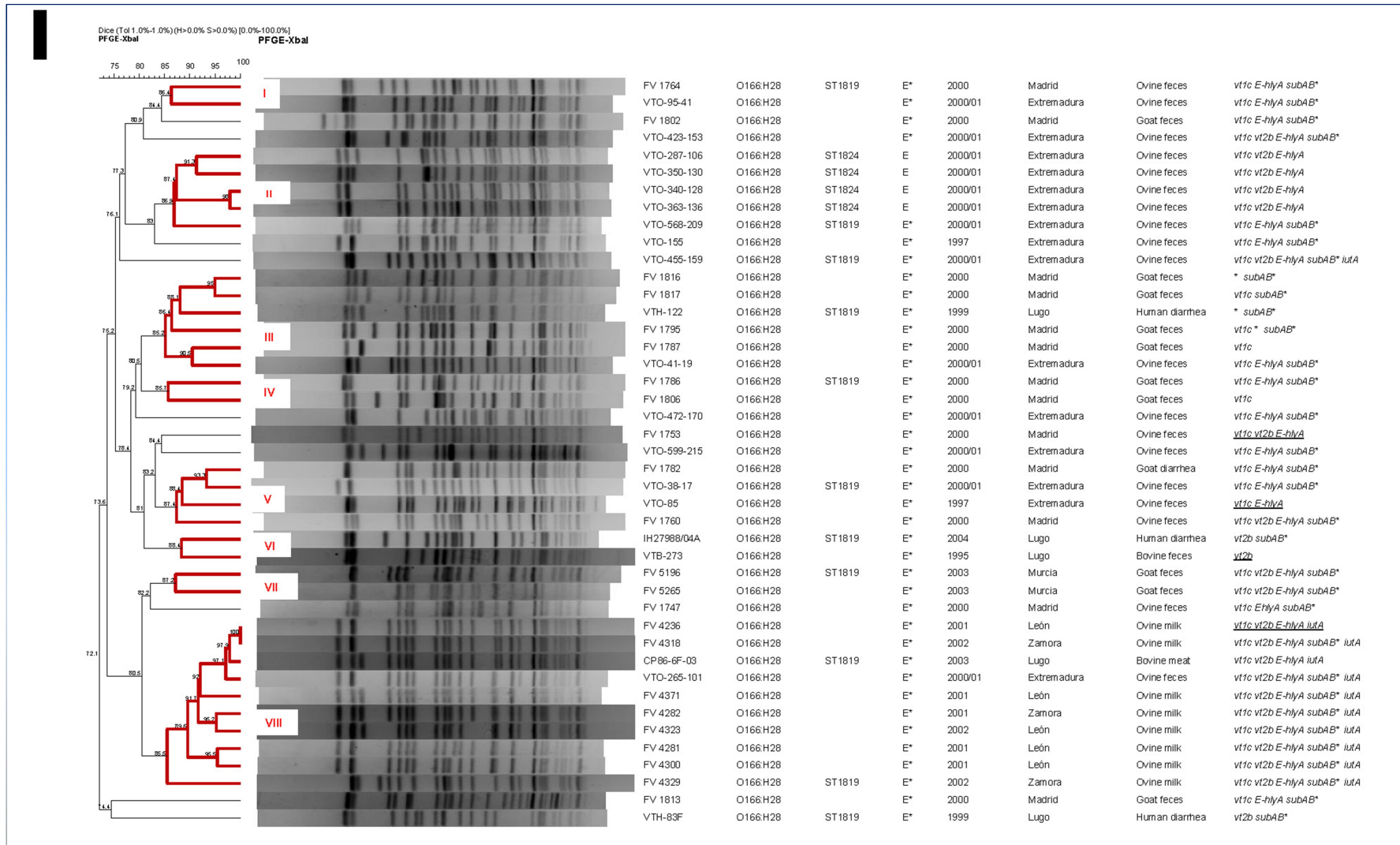


Figura 43. Dendrograma de los perfiles de PFGE de las 43 cepas ECVT O166:H28. A la derecha del dendrograma figuran código de cepa, serotipo, ST, filogruppo, año de aislamiento, origen geográfico y de aislamiento, genes de virulencia. E* filogruppo deducido por la ST (no tipable según el esquema de Clermont *et al.* 2013). *FV 1816 originariamente *vt1* y VTH-122 originariamente *vt2*. Los resultados positivos a la variante cromosómica de la subtilasa se indican como *subAB** (subrayadas las 4 cepas que no pudieron ser analizadas para dicho gen)

4.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La caracterización de las estructuras poblacionales juega un papel fundamental para la comprensión de los brotes y la dinámica de la propagación bacteriana. En *E. coli*, el uso generalizado de los esquemas de *multiplex* PCR para la determinación de filogrupos, junto con el algoritmo eBURST, presenta algunas limitaciones. Incluso en el mejor de los escenarios, estos métodos fallan previsiblemente a la hora de identificar variantes recombinantes que pueden dar lugar a la emergencia de combinaciones exitosas derivadas de filogrupos muy relacionados como el A y B1 (Turrientes *et al.* 2014). En el presente estudio constatamos, además, la complejidad de las asignaciones de los filogrupos F y E recombinantes a determinados grupos clonales. Es por ello que utilizamos diferentes aproximaciones (esquema de filogrupos de Clermont basado en la *cuadriplex* PCR, algoritmo Neighbor-Joining y algoritmo eBURST) con objeto de conocer la estructura filogenética de nuestra colección.

4.6.1. Análisis filogenético mediante el algoritmo Neighbor-Joining

Realizamos una visualización de la estructura de la población basada en las secuencias concatenadas de genes MLST mediante la construcción de un árbol Neighbor-Joining, con un número de réplicas *bootstrap* de 1000. Para dicho análisis se utilizó el programa MEGA6 (Tamura *et al.* 2013) (Figura 44).

La distribución de las ST en el árbol mostró que las asignaciones de filogrupos realizada mediante la *cuadriplex* PCR de Clermont era coherente en todos los casos, con la salvedad de la ST1797 (filogrupo A), que en el árbol aparece vinculada a las ST1824 y ST1819 (filogrupo E). Además, en el árbol filogenético de la Figura 44 se puede apreciar la diversidad genética entre las 41 ST identificadas en las cepas de ECVT de nuestra colección. De acuerdo con Tenaillon *et al.* (2010), a pesar de la ocurrencia de eventos de recombinación, la estructura de la población de *E. coli* es predominantemente clonal, lo que permite la delineación de los principales grupos filogenéticos. Según su revisión, la estructura genética de las cepas comensales de *E. coli* estaría determinada por múltiples factores ambientales y del huésped, y los determinantes involucrados en la virulencia de la bacteria podrían de hecho reflejar la adaptación a los hábitats comensales; a través de la caracterización del nicho comensal, se podría comprender cómo un comensal útil puede convertirse en un patógeno nocivo. Sin embargo, los mismos autores indican en esta revisión, así como en otros trabajos, que los nuevos datos obtenidos en el laboratorio indicarían una mayor diversidad de la que se conocía previamente para las cepas de comensales humanas y animales, con la existencia de al menos 5 clades fuera de las cepas clásicas de *E. coli* representadas en la colección ECOR (Walk *et al.* 2009; Clermont *et al.* 2011).

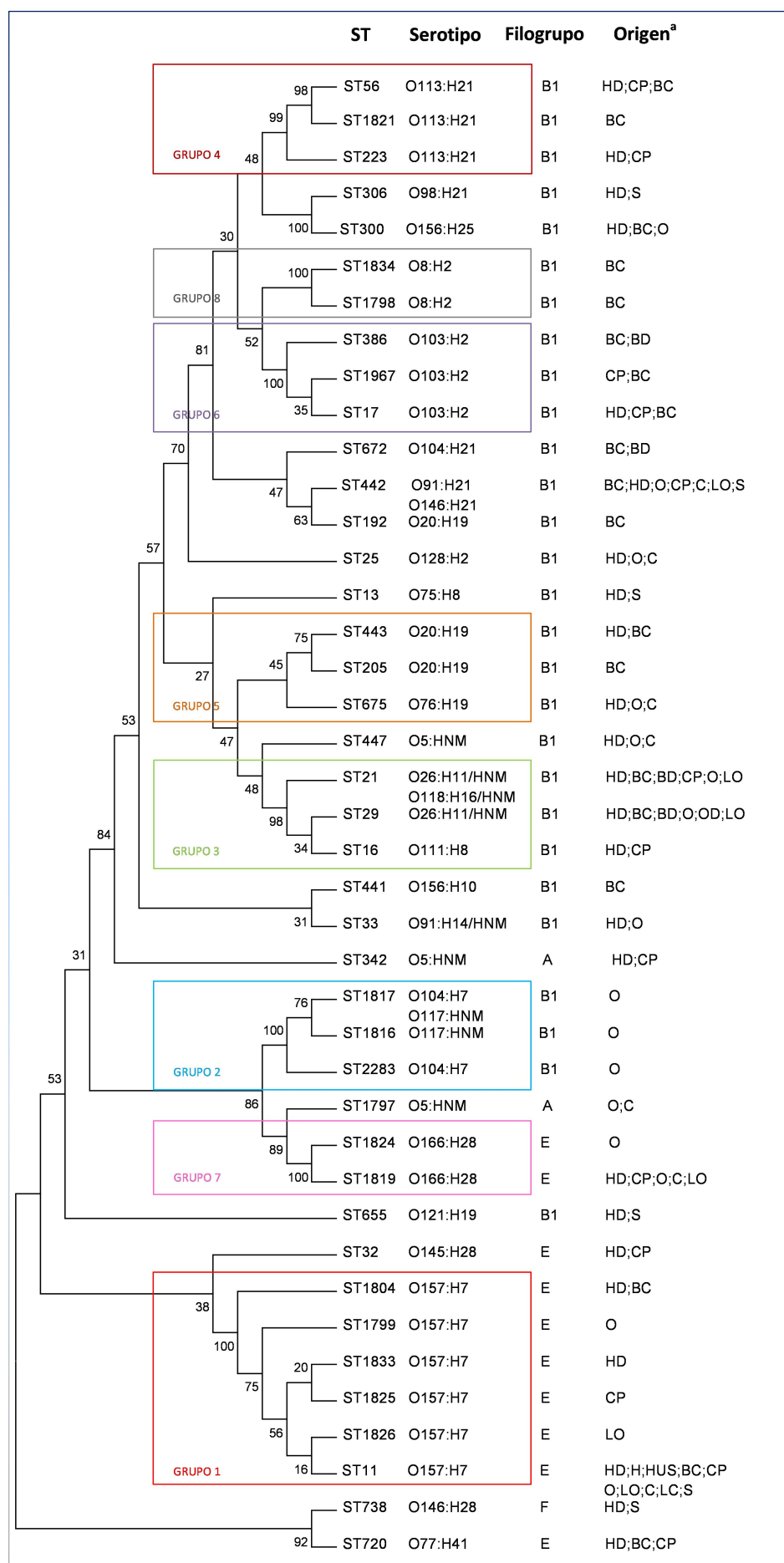


Figura 44. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias concatenadas de los 7 genes conservados que definen las 41 ST detectadas entre las cepas de nuestra colección. Para su construcción se empleó el programa MEGA6 (Tamura et al. 2013) en base al algoritmo Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) y el método de *p-distance* (Nei y Kumar, 2000) para calcular las distancias evolutivas. Los números en el árbol indican los valores *bootstrap* calculados para 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) de puntos de ramificación > 50%.
^aOrigen de aislamiento: HD: pacientes con diarrea; H: portador asintomático sano; HUS: pacientes con síndrome urémico hemolítico; BC: heces bovino sano; BD: heces bovino con diarrea; CP: carne picada; O: heces ovino sano; OD: heces ovino con diarrea; LO: leche caprino; C: heces caprino con diarrea; LC: leche caprino; S: heces de animales silvestres. Los cuadros enmarcan los “Grupos” calculados con el algoritmo eBURST, que se detallan en el siguiente apartado.

4.6.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO MEDIANTE EL ALGORITMO eBURST

Uno de los campos más prometedores de la epidemiología molecular bacteriana es la caracterización de la dinámica de los cambios poblacionales, en el marco espacial y/o temporal. La técnica de electroforesis en campo pulsado, la cual hemos aplicado a todas las cepas de la presente colección, es útil para la determinación de brotes clonales locales, así como para los análisis de variabilidad dentro de un grupo comparable (como es el caso de los grupos clonales de la presente tesis doctoral); pero la reconstrucción de la estructura de la población de *Escherichia coli* se basan en la combinación de 2 enfoques analíticos diferentes. El primer enfoque identifica eventos macroevolutivos basados en la asignación de las cepas a linajes filogenéticos particulares; estos eventos macroevolutivos reflejan procesos bacterianos de "especiación similar" a lo largo de grandes periodos de tiempo y espacio (Wirth *et al.* 2006). El segundo enfoque detecta eventos microevolutivos, lo que refleja las variaciones recientes involucradas en las adaptaciones locales; estas detecciones se basan en la práctica en la identificación de variantes alélicas en fragmentos cortos de secuencia correspondientes a los 7 genes conservados seleccionados para determinar los patrones de ST (Maiden *et al.* 1998; Turrientes *et al.* 2014). La combinación de los análisis micro y macroevolutivos permite comprender e interpretar la diseminación local reciente de clones específicos, y deducir la evolución, especialmente cuando se aplica a linajes definidos (Turrientes *et al.* 2014).

La caracterización precisa de las cepas bacterianas en base a los alelos y perfiles alélicos inferidos por la herramienta MLST (eventos microevolutivos) se traduce en patrones comparables entre los distintos laboratorios de todo el mundo, tanto en estudios epidemiológicos locales como internacionales. Según Feil *et al.* (2004), el análisis de todos los perfiles alélicos mediante la aplicación del algoritmo eBURST, permite deducir las relaciones genéticas en la estructura de la población, amortiguando el efecto de recombinación.

4.6.2.1. Estructura y relaciones genéticas de la población de ECVT

Aplicamos el algoritmo eBURST para analizar, en primer lugar, la interrelación existente entre las 41 ST identificadas en la colección de 820 cepas del presente estudio. Para el análisis se aplicó el criterio más conservador, de forma que los datos de MLST fueron subdivididos en grupos no solapantes de ST relacionadas o Complejos Clonales (CC), de manera que todos los miembros de un mismo grupo compartieron alelos idénticos en ≥ 6 de los 7 loci con al menos otro miembro del grupo. El genotipo fundador (ancestro) de cada CC quedó identificado como aquel dentro del grupo con el mayor número de variantes en un único locus = *single locus variants* (SLV) relacionados. En algunos casos, un SLV del fundador primario puede diversificar para producir múltiples SLV y se identifica como un fundador de un subgrupo (Feil *et al.* 2004).

El resultado de este análisis corroboró la consistencia de los grupos clonales definidos entre las 820 cepas (Tabla 30 y Tabla 31). Las 41 ST quedaron distribuidas en 8 grupos (25 de las 41 ST) y 16 patrones únicos = *singletons* (Figura 45).

eBURST Report - Mon Mar 21 11:24:13 CET 2016
 No. isolates = 45 | No. STs = 41 | No. re-samplings for bootstrapping = 1000
 No. loci per isolate = 7 | No. identical loci for group def = 6 | No. groups = 8

Group 1: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 11

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
11	1	5	0	0	0	1.0	97%	81%
1833	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%
1825	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%
1804	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%
1799	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%
1826	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%

Group 2: No. Isolates = 4 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 1817

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1817	2	2	0	0	0	1.0	32%	0%
1816	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
2283	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 3: No. Isolates = 4 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 29

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
29	1	2	0	0	0	1.0	28%	0%
21	2	1	1	0	0	1.5	0%	0%
16	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 4: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 56

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
56	1	2	0	0	0	1.0	31%	0%
223	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1821	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 5: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 205

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
205	1	2	0	0	0	1.0	32%	0%
675	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
443	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 6: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 17

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
17	1	2	0	0	0	1.0	30%	0%
386	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1967	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 7: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1819	1	1	0	0	0	1.0
1824	1	1	0	0	0	1.0

Group 8: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1834	1	1	0	0	0	1.0
1798	1	1	0	0	0	1.0

Singletons: size 16

ST
 25; 192; 672; 738; 447; 13; 442; 441; 1797; 342; 720; 33; 32; 306; 655; 300

Figura 45. Análisis eBURST de las 41 ST del presente estudio

En el Grupo 1 quedaron incluidas las ST correspondientes al grupo clonal O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ST1804/ST1825/ST1826/ST1833 definido en este estudio. Todas las ST de este grupo son SLV de la ST11.

En el Grupo 2 se agruparon las ST correspondientes a los grupos clonales ST104:H7-B1-ST1817/ST2283 y O117:HNM-B1/ST1816/ST1817. Al comparar los perfiles de macrorrestricción de las 19 cepas (Figura 46) se observó que quedaban distribuidas por serotipo en el dendrograma, con la excepción de una cepa O104:H7 (VTO-173) que quedó agrupada con las 9 cepas O117:HNM y presentó una similitud del 80,2% con 5 de ellas. Los datos epidemiológicos de las cepas (todas aisladas de ganado ovino, Extremadura, entre 1997-2001), sus perfiles genéticos (todas *vt1c* y la mayoría *katP*) y filogenéticos (ST1816, ST1817, ST2283 forman un grupo de 3 SLV = complejo clonal, en el que el ST1817 sería predictivamente el fundador), apuntan a un origen clonal común y una diversificación genética posterior.

En el Grupo 3 se agruparon las ST correspondientes a los grupos clonales O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29, O118:H16/HNM-B1-ST21 y O111:[H8]-B1-ST16, cuyas ST (16, 21 y 29) están incluidas en el ST29 Cplx de la base MLST. Al comparar los perfiles de macrorrestricción de las 149 cepas respectivas, se observó en el dendrograma que el grupo clonal O111:[H8]-B1-ST16 quedaba diferenciado del resto (datos no mostrados). Sin embargo, las 13 cepas O118:H16/HNM-B1-ST21 se distribuyeron en el dendrograma con las cepas O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29, formándose 3 pequeños clústeres de identidad >85% con cepas de ambos grupos. En la Figura 47 se muestra parte de este dendrograma, con 2 de los 3 clústeres. Tanto el análisis comparativo de los perfiles de macrorrestricción, como los perfiles genéticos (todas las cepas O26 y O118 *vt1a*, *eae-β1*, *iutA*; todas las cepas O111 *vt1a*, *eae-θ*) y filogenéticos (ST del mismo ST Cplx) señalan el origen clonal común, con una diversificación posterior, en el que el grupo clonal O111:[H8]-B1-ST16 habría acumulado un mayor número de eventos genéticos.

En el Grupo 4 quedaron incluidas las ST correspondientes al grupo clonal O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821 definido en el presente estudio. Las ST56 y ST223 figuran dentro del ST155 Cplx de la base MLST, siendo respectivamente TLV y DLV de la ST155. Sin embargo, las 3 ST (56, 223 y 1821) estarían genéticamente más próximas entre sí, siendo SLV de la ST56, pudiendo considerarse por definición un subgrupo con la ST56 como genotipo fundador.

En el Grupo 5 se agruparon las ST correspondientes a los grupos clonales O20:H19-B1-ST205/ST443 y O76:H19-B1-ST675 del presente estudio. Al comparar los perfiles de macrorrestricción de las 37 cepas (Figura 48) se observó que quedaban claramente separadas por serotipo en el dendrograma, con tan solo 67,8% de similitud entre las cepas de ambos grupos clonales. También es importante destacar que la mayoría de las cepas del grupo clonal O20:H19-B1-ST205/ST443 poseían el gen *saa* y 2 de las 7 cepas de este grupo clonal eran

positivas para la variante plasmídica del gen *subAB*, sin embargo, las cepas del grupo clonal O76:H19-B1-ST675 fueron todas negativas para el gen *saa* y todas eran portadoras de la variante cromosómica de *subAB*. Los datos epidemiológicos de las cepas, sus perfiles genéticos y filogenéticos (las ST205 y ST443 están incluidas en el ST205 Cplx de la base MLST; la ST675 no tiene asignación a ninguna ST Cplx, pero es una SLV de la ST205), apuntarían a un origen común y una posible adaptación genética posterior al hospedador, en la que el grupo clonal O20:H19-B1-ST205/ST443 tendría como hospedador al ganado bovino (perfil *vt1a vt2a E-hlyA espP saa subAB₁*) y el grupo clonal O76:H19-B1-ST675 a los pequeños rumiantes, ovino/caprino (perfil *vt1c, E-hlyA, subAB₂*).

En el Grupo 6 quedaron incluidas las ST correspondientes al grupo clonal O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967 del presente estudio. Las ST17 y ST386 figuran en el ST20 Cplx de la base MLST, siendo respectivamente SLV y DLV de la ST20. La ST1967 (sin asignación) es una SLV de las ST17 y ST386, y una DLV de la ST20. Por definición, las 3 ST (17, 386 y 1967) podrían constituir un subgrupo con la ST17 como genotipo fundador.

En el Grupo 7 quedaron incluidas las ST correspondientes al grupo clonal O166:H28-E-ST1819/SST1824 del presente estudio. Ambas ST presentan una única diferencia alélica.

En el Grupo 8 quedaron incluidas las ST correspondientes al grupo clonal O8:H2-B1-ST1798/ST1834 del presente estudio. Ambas ST presentan una única diferencia alélica.

En el presente estudio identificamos la ST442 asociada a los serotipos O91:[H21] y O146:[H21]. Al comparar sus perfiles de macrorrestricción (Figura 49) se observó que a pesar de la alta heterogeneidad dentro de ambos grupos (<60% similitud entre las cepas O146:[H21]), las cepas quedaban básicamente agrupadas por serotipo. El reducido número de cepas O91:[H21] y su circunscripción temporal y geográfica (Lugo, 1994-95) no permiten obtener conclusiones sobre el origen y deriva de ambos grupos.

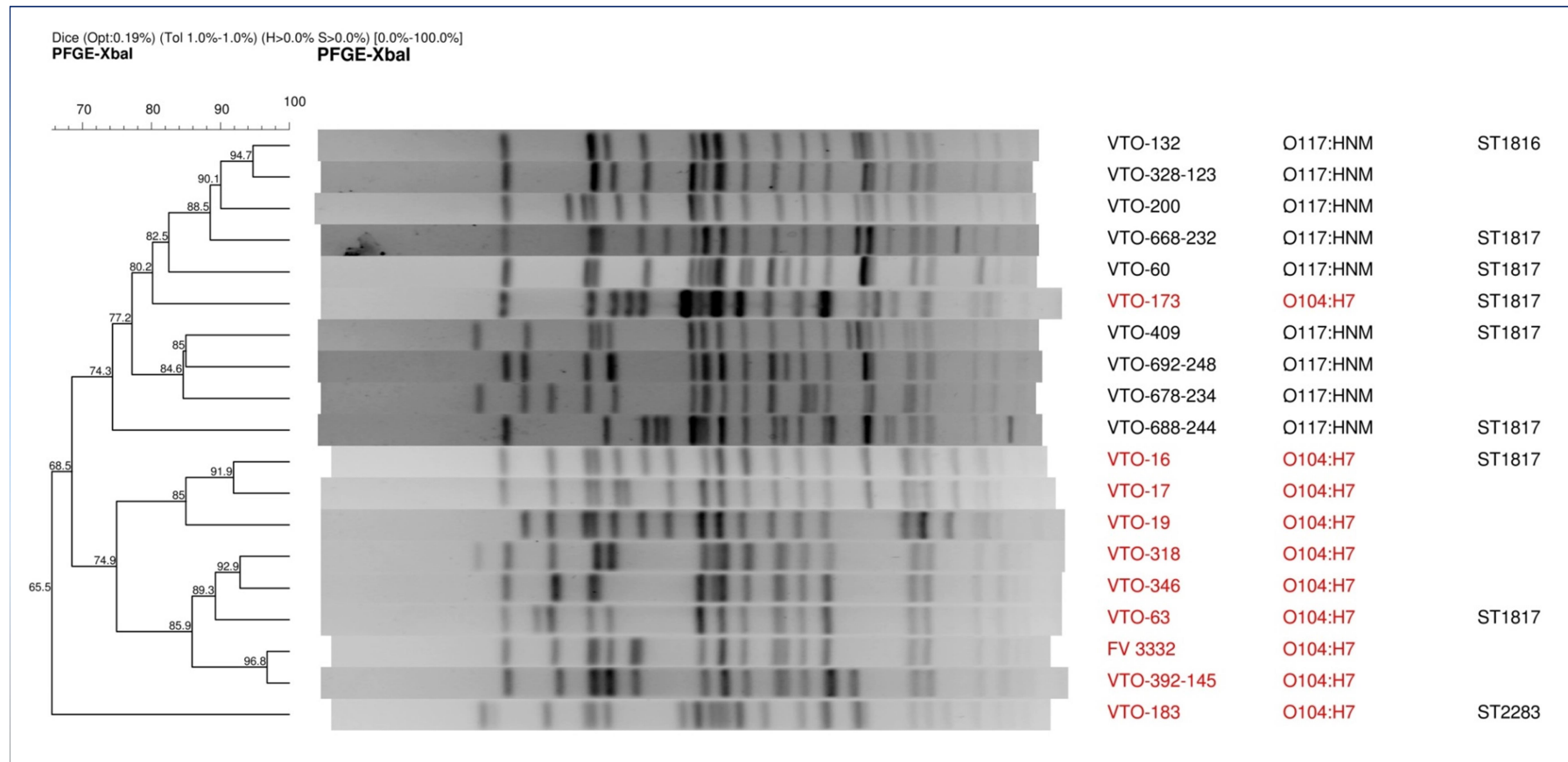


Figura 46. Dendrograma comparativo de las 19 cepas pertenecientes a los grupos clonales ST104:H7-B1-ST1817/ST2283 (señaladas en color rojo) y O117:HNM-B1/ST1816/ST1817. Los datos epidemiológicos de las cepas (todas aisladas de ganado ovino, Extremadura, entre 1997-2001) y genotípicos (todas *vt1c* y la mayoría *katP*) hacen pensar en un origen inicial común, y una diversificación genética posterior para formar los respectivos grupos clonales



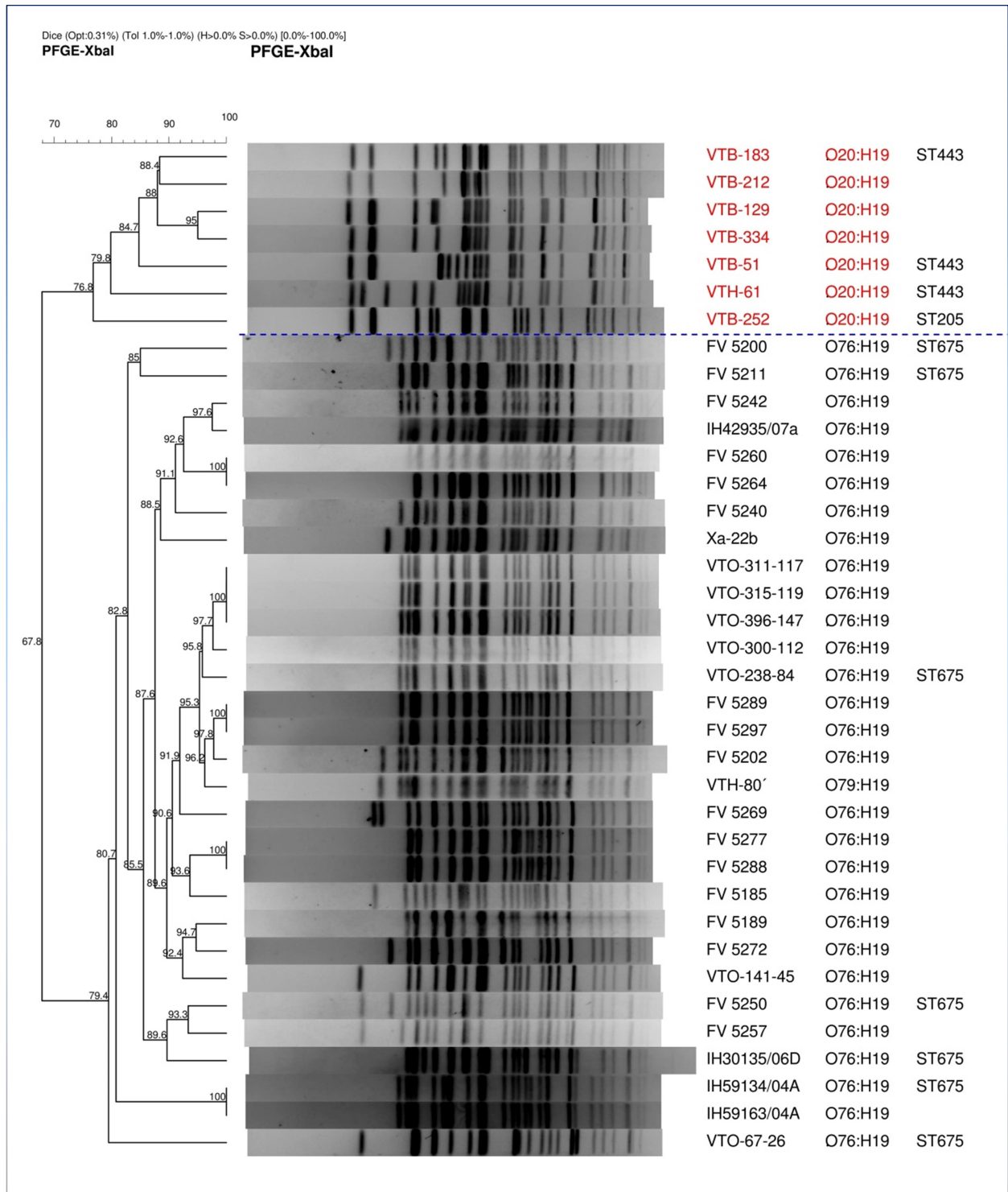


Figura 48. Dendrograma comparativo de las 37 cepas pertenecientes a los grupos clonales O20:H19-B1-ST205/ST443 (en rojo) y O76:H19-B1-ST675. Los datos epidemiológicos de las cepas, sus perfiles genéticos y filogenéticos apuntarían a un origen clonal común y una adaptación genética posterior al hospedador



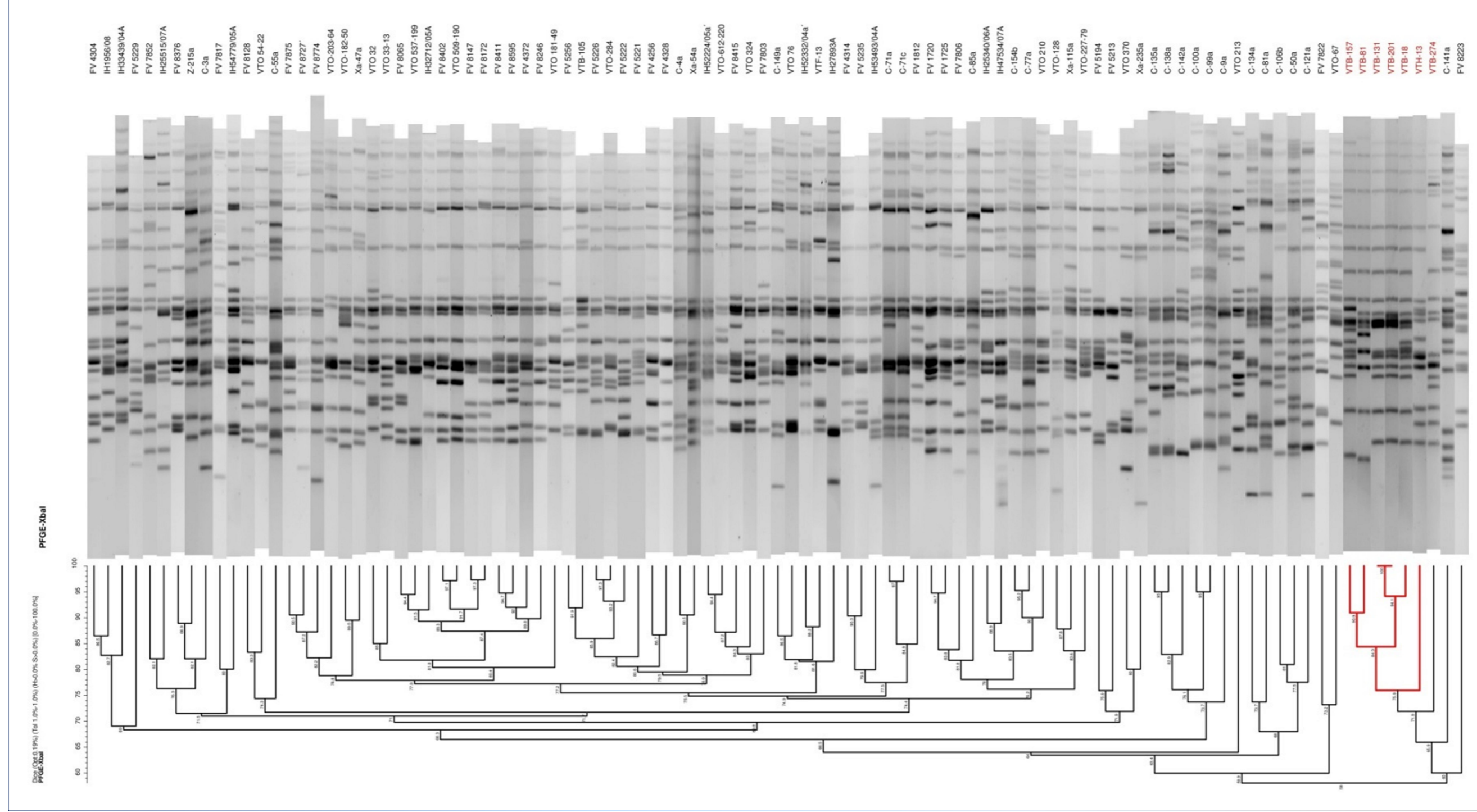


Figura 49. Dendrograma comparativo de las 107 cepas pertenecientes a los grupos clonales O91:[H21]-B1-ST442 (en rojo) y O146:[H21]-B1-ST442



4.6.2.2. Estructura y relaciones genéticas dentro de la población de *E. coli*

En segundo lugar se analizó la interrelación de las 41 ST identificadas en este estudio con respecto a la población de *E. coli* representada por la base de MLST (*legacy* MLST a fecha de marzo de 2016). El análisis mediante el algoritmo eBURST aplicado a un total de 8.001 cepas pertenecientes a 4.910 ST dio como resultado una distribución de las ST en 325 grupos. Treinta y ocho de las 41 ST del presente estudio quedaron incluidas en 13 de esos 325 grupos (Grupos 1, 22, 53, 66, 100, 153, 156, 170, 181, 191, 292, 299, 300); y 3 ST (ST672, ST738, ST441) formaron parte de los 1.047 *singletons* identificados (Figura 50).

En el análisis poblacional global, el Grupo 1 es el de mayor tamaño (en marzo de 2016 contaba con 1.582 ST), en el que la ST10 se predice como genotipo fundador. Dentro de este Complejo Clonal (CC10) quedarían incluidas 17 de las 41 ST del presente estudio. Este hallazgo corrobora que el CC10 no solo engloba importantes linajes de ExPEC (Ojer-Usoz *et al.* 2017), sino también linajes de *E. coli* diarreagénicos (Yu *et al.* 2017). Específicamente en el caso de los diarreagénicos, Yu *et al.* (2017) identifican el CC10 en cepas de los patotipos ECEA, ECET, ECEP y ECVT.

Es importante señalar que dentro del Grupo 1 identificamos la ST1797, lo que confirmaría su asignación al filogrupo A, puesto que los miembros del CC10 pertenecen a dicho filogrupo. En el árbol generado mediante el algoritmo Neighbor-Joining, esta asignación no quedaba clara (Figura 44), lo que confirma la necesidad de emplear diferentes aproximaciones en los análisis de estructura poblacional. En el diagrama generado por eBURST v3 (Figura 51) se representan las relaciones de estas 17 ST dentro del CC10.

En el Grupo 22, con la ST11 como genotipo fundador, quedaron englobadas las 6 ST que identificamos en este estudio para el grupo clonal O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ST1804/ST1825/ST1826/ST1833 (Figura 52).

Los Grupos 53, 66 y 100 incluyen, respectivamente, las ST32, ST25 y ST720, que además se identifican como genotipos fundadores de dichos Complejos Clonales (Figuras 53 a 55).

Los Grupos 153, 156 y 170 agruparían 3 ST cada uno, siendo las ST306, ST300 y ST655 (presentes entre las 41 ST de este estudio), respectivamente, los genotipos fundadores de dichos grupos (Figuras 56 a 58).

El Grupo 181 agrupa las 3 ST (1817, 1816 y 2283) descritas por primera vez en las cepas de este estudio, con la ST1817 como genotipo fundador (Figura 60).

Los Grupos 191, 292, 299 y 300 incluyen solo 2 ST cada uno de ellos, por lo que no predicen genotipo fundador. Concretamente las 2 ST de los Grupos 299 (ST1834, ST1798) y 300 (ST1819, ST1824) se identificaron por primera vez en cepas de este estudio (Figura 50).

La Figura 60 muestra la diversidad clonal de 8.001 cepas de *Escherichia coli* pertenecientes a 4.910 ST identificadas en la base de datos pública MLST de la Universidad de Warwick. Se utilizó eBURST v3 para generar la instantánea de población (*population snapshot*). Cada círculo corresponde a una de las 4.910 ST, cuyo tamaño es proporcional al número de aislamientos. Las ST que también son SLV están conectadas con líneas negras. Los fundadores primarios (azul) se ubican centralmente en cada grupo, y los fundadores de los subgrupos se muestran en amarillo.



eBURST Report - Tue Mar 22 14:36:58 CET 2016
 No. isolates = 8001 | No. STs = 4910 | No. re-samplings for bootstrapping = 1000
 No. loci per isolate = 7 | No. identical loci for group def = 6 | No. groups = 325

Group 1: No. Isolates = 2803 | No. STs = 1582 | Predicted Founder = 10

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
10	311	177	212	138	1054	4.51	100%	100%
1797	1	23	193	217	1148	4.89	0%	0%
205	4	7	16	70	1488	5.34	0%	53%
443	4	5	15	71	1490	5.33	0%	36%
29	49	20	37	102	1422	5.51	0%	100%
21	73	20	18	22	1521	6.01	0%	100%
13	5	14	13	55	1499	5.13	0%	99%
675	2	8	21	66	1486	5.33	0%	71%
33	28	16	8	135	1422	4.82	0%	100%
442	4	11	12	38	1520	5.49	0%	99%
17	11	12	12	13	1544	5.77	0%	99%
386	2	2	13	9	1557	6.28	0%	0%
1967	1	3	12	18	1548	5.83	0%	0%
447	2	8	41	193	1339	4.93	0%	58%
16	7	8	19	44	1510	5.70	0%	71%
56	4	11	28	59	1483	5.57	0%	87%
223	6	18	67	103	1393	4.99	0%	98%
1821	1	1	11	33	1536	5.85	0%	0%

Group 22: No. Isolates = 45 | No. STs = 20 | Predicted Founder = 11

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
11	20	15	4	0	0	1.21	100%	100%
335	4	6	13	0	0	1.68	39%	81%
1804	4	4	11	4	0	2.0	0%	11%
2966	1	4	11	4	0	2.0	1%	10%
3064	1	4	11	4	0	2.0	3%	10%
4169	1	4	11	4	0	2.0	5%	10%
1826	1	3	12	4	0	2.05	1%	0%
1116	1	3	12	4	0	2.05	1%	0%
587	1	3	12	4	0	2.05	3%	0%
1595	1	2	17	0	0	1.89	0%	0%
1833	1	2	15	2	0	2.0	0%	0%
1825	1	2	15	2	0	2.0	0%	0%
1799	1	2	13	4	0	2.10	0%	0%
3506	1	2	13	4	0	2.10	0%	0%
4068	1	2	6	11	0	2.47	0%	0%
3293	1	2	6	11	0	2.47	0%	0%
4455	1	1	15	3	0	2.10	0%	0%
1787	1	1	15	3	0	2.10	0%	0%
595	1	1	6	12	0	2.57	0%	0%
61	1	1	6	12	0	2.57	0%	0%

Group 53: No. Isolates = 16 | No. STs = 8 | Predicted Founder = 32

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
32	7	4	3	0	0	1.42	57%	49%
137	1	4	3	0	0	1.42	62%	50%
1096	1	2	3	2	0	2.0	0%	0%
777	1	2	3	2	0	2.0	0%	0%
2942	3	1	5	1	0	2.0	0%	0%
1034	1	1	3	3	0	2.28	0%	0%
524	1	1	3	3	0	2.28	0%	0%
525	1	1	3	3	0	2.28	0%	0%

Group 66: No. Isolates = 8 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 25

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
25	2	5	1	0	0	1.16	96%	77%
811	1	2	4	0	0	1.66	2%	0%
3400	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%
2826	1	1	4	1	0	2.0	0%	0%
1419	1	1	4	1	0	2.0	0%	0%
1418	1	1	4	1	0	2.0	0%	0%
4748	1	1	2	3	0	2.33	0%	0%

Figura 50. Análisis eBURST de la base completa MLST: solo se muestran los 13 Grupos que incluyen 38 de las 41 ST (en rojo) del presente estudio

Group 100: No. Isolates = 12 No. STs = 5 Predicted Founder = 720								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
720	8	4	0	0	0	1.0	95%	48%
4607	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%
1955	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%
1884	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%
5867	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%
Group 153: No. Isolates = 20 No. STs = 3 Predicted Founder = 306								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
306	17	2	0	0	0	1.0	31%	0%
298	2	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1055	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
Group 156: No. Isolates = 34 No. STs = 3 Predicted Founder = 300								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
300	29	2	0	0	0	1.0	30%	0%
688	4	1	1	0	0	1.5	0%	0%
4942	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
Group 170: No. Isolates = 5 No. STs = 3 Predicted Founder = 655								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
655	2	2	0	0	0	1.0	31%	0%
800	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1869	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
Group 181: No. Isolates = 3 No. STs = 3 Predicted Founder = 1817								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1817	1	2	0	0	0	1.0	31%	0%
1816	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
2283	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
Group 191: No. Isolates = 3 No. STs = 2 Predicted Founder = None								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance		
192	2	1	0	0	0	1.0		
1356	1	1	0	0	0	1.0		
Group 292: No. Isolates = 9 No. STs = 2 Predicted Founder = None								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance		
342	7	1	0	0	0	1.0		
659	2	1	0	0	0	1.0		
Group 299: No. Isolates = 2 No. STs = 2 Predicted Founder = None								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance		
1834	1	1	0	0	0	1.0		
1798	1	1	0	0	0	1.0		
Group 300: No. Isolates = 3 No. STs = 2 Predicted Founder = None								
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance		
1819	2	1	0	0	0	1.0		
1824	1	1	0	0	0	1.0		
Singletons (No = 1047): ST672, ST738, ST441								

Figura 50. Análisis eBURST (continuación)

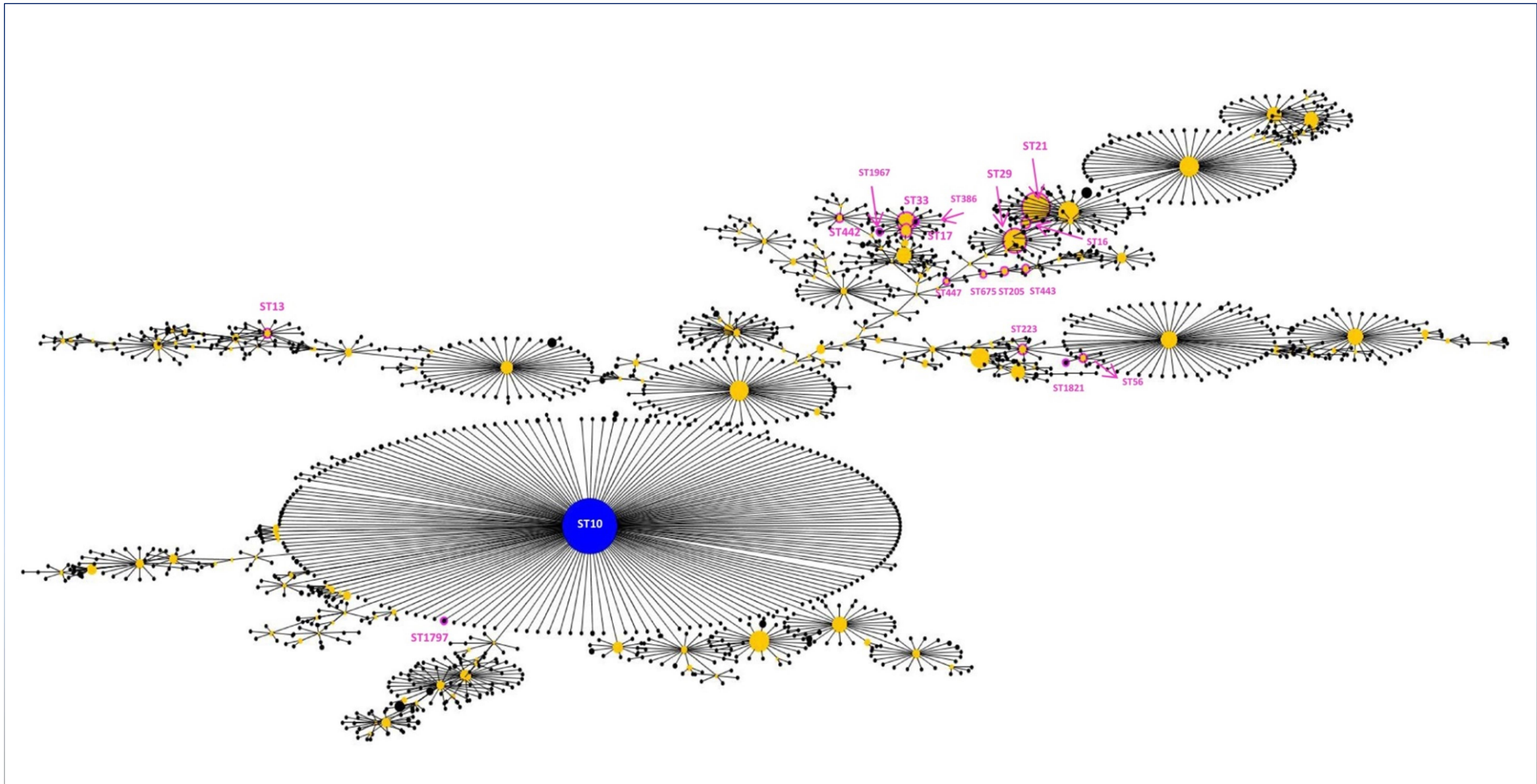


Figura 51. Representación del Complejo Clonal 10 definido por eBURST (Grupo 1). En color azul figura el genotipo fundador y en fucsia las 17 ST identificadas en este estudio

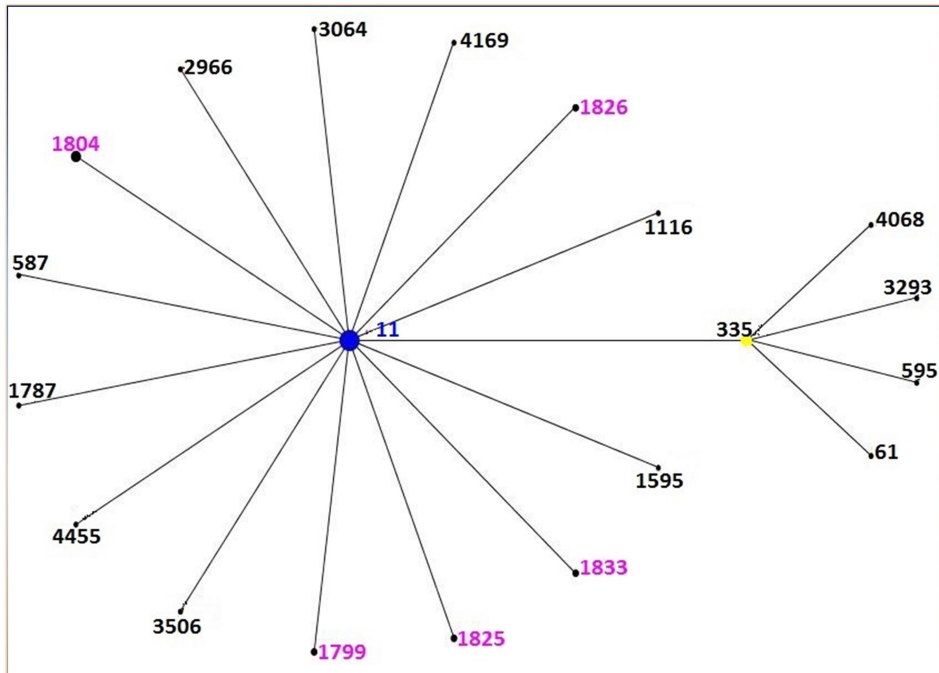


Figura 52. Representación del Complejo Clonal 11 definido por eBURST (Grupo 22). En color azul figura el genotipo fundador y en fucsia las otras 5 ST identificadas en este estudio junto a la ST11

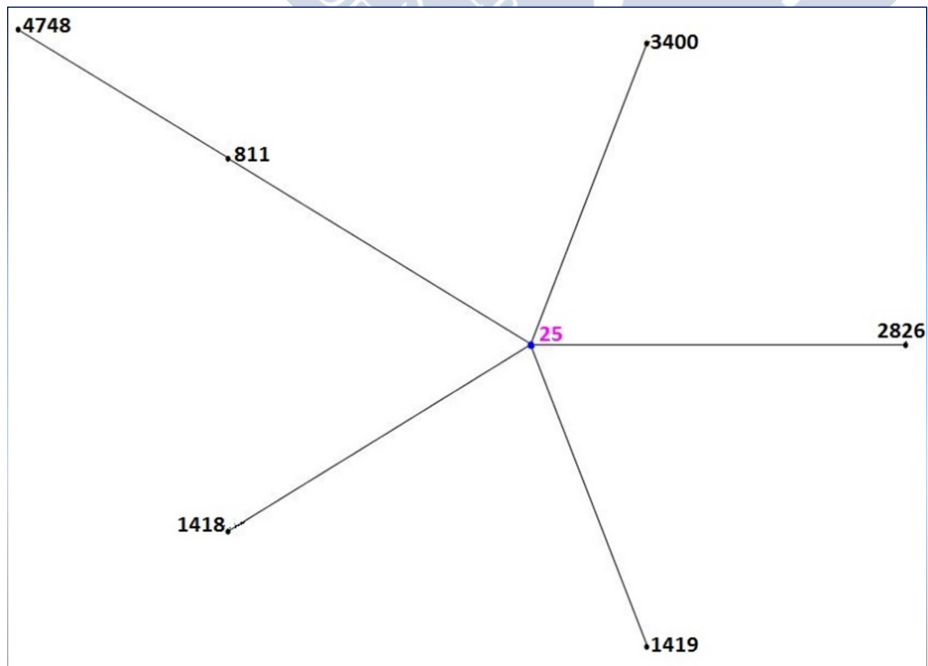


Figura 53. Representación del Complejo Clonal 25 (Grupo 66)

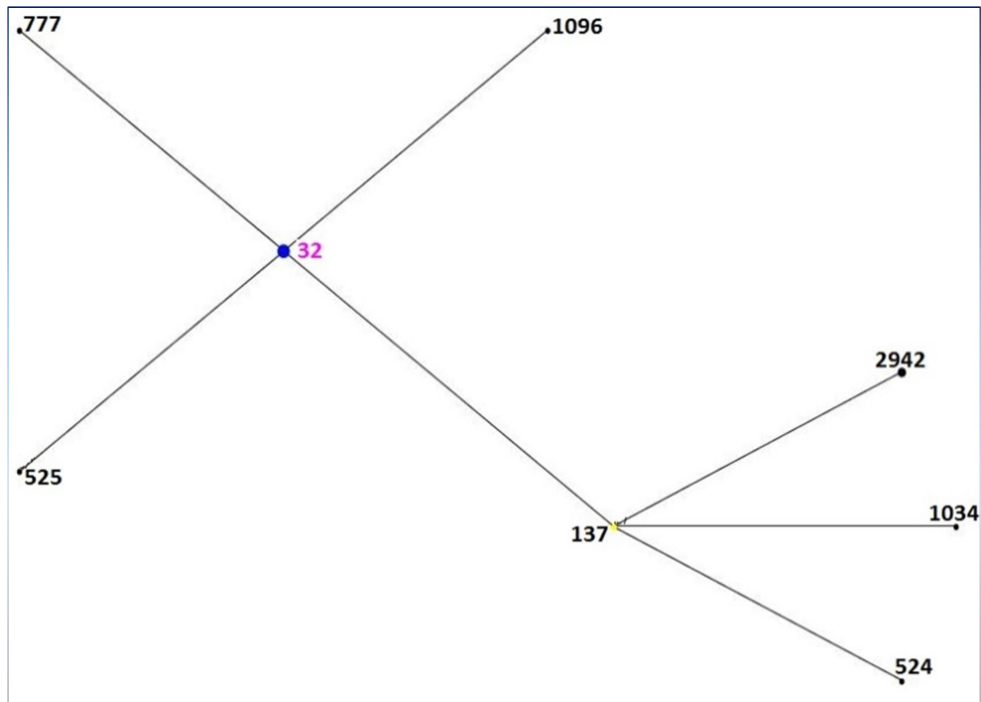


Figura 54. Representación del Complejo Clonal 32 (Grupo 53)

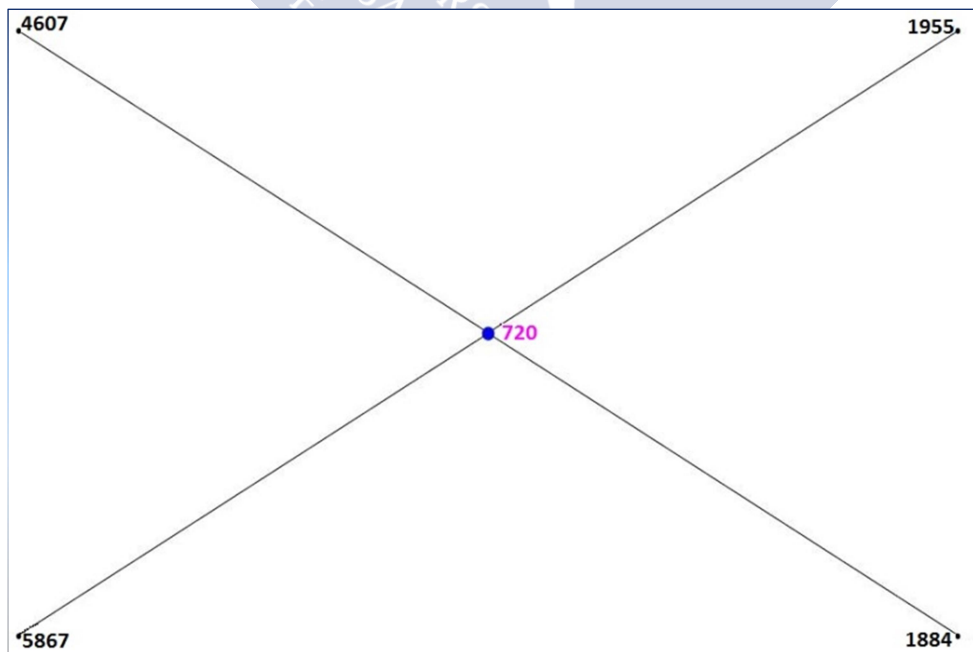
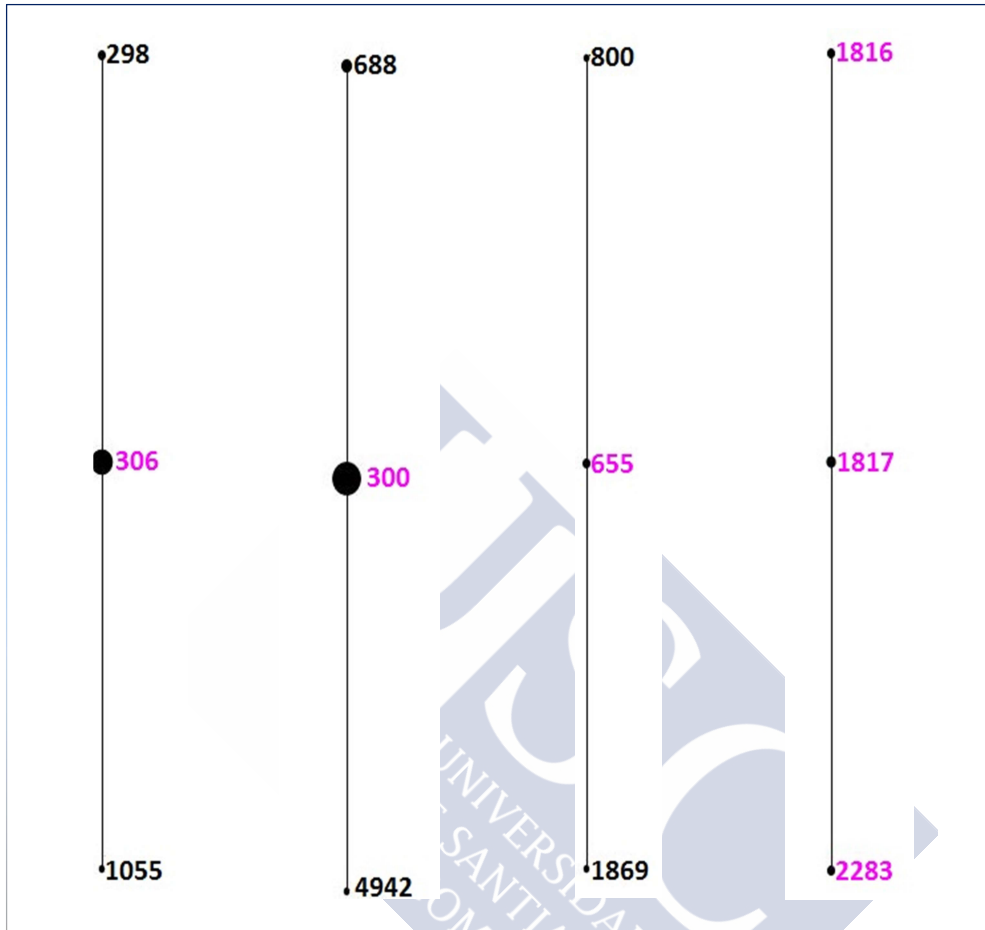


Figura 55. Representación del Complejo Clonal 720 (Grupo 100)



Figuras 56 a 59. Representación de los Complejos Clonales 306 (Grupo 153), 300 (Grupo 156), 655 (Grupo 170) y 1817 (Grupo 181), respectivamente

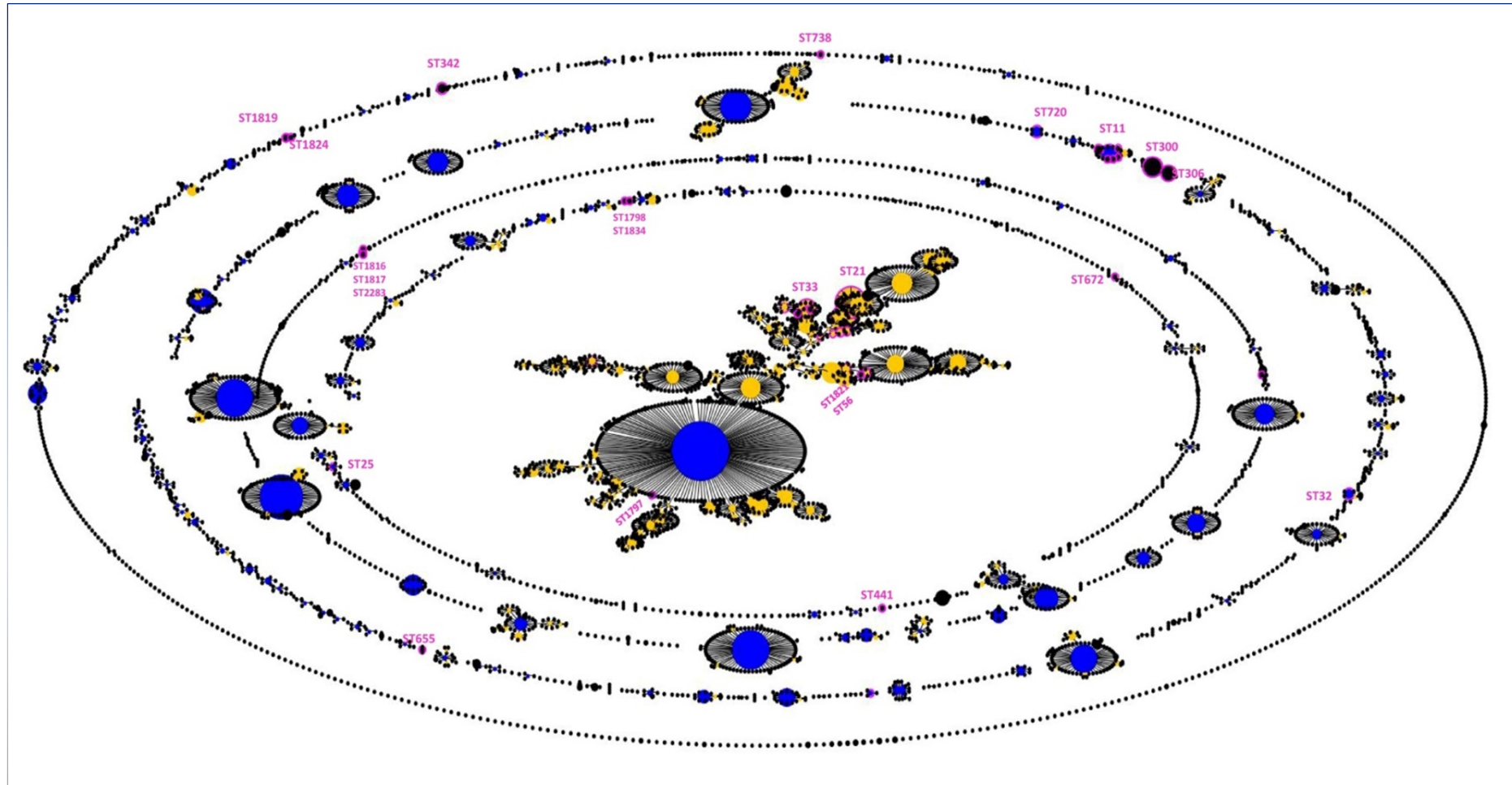


Figura 60. Representación de las relaciones entre todas las ST de la base MLST de *E. coli* (*population snapshot*). En color fucsia las principales ST identificadas en este estudio



5. CONCLUSIONES



1ª. En la presente tesis doctoral demostramos que O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29, O146:[H21]-B1-ST442 y O157:[H7]-E-ST11/ST1799/ ST1804/ST1825/ST1826/ST1833 son los grupos clonales más ampliamente adaptados a diferentes hospedadores (como son el ganado ovino, bovino, caprino, o diferentes especies silvestres), demostramos asimismo su transmisión alimentaria al hombre a través de alimentos derivados de los rumiantes de producción, dada la alta similitud encontrada entre los aislados de origen humano y animal.

2ª. Encontramos además una alta identidad genética entre cepas de origen clínico humano y animal de los grupos clonales O5:HNM-A-ST342 (animales de origen silvestre y vacuno), O5:HNM-B1-ST447 (pequeños rumiantes), O76:H19-B1-ST675 (pequeños rumiantes y silvestres), O91:[H14]/HNM-B1-ST33 (vacuno), O103:[H2]-B1-ST17/ST386/ST1967 (vacuno), O111:[H8]-B1-ST16 (vacuno), O113:H21-B1-ST56/ST223/ST1821 (vacuno), O118:H16/HNM-B1-ST21 (vacuno), O121:H19-B1-ST655 (silvestres), O128:[H2]-B1-ST25 (ovino), O145:[H28]-E-ST32 (vacuno y silvestres), O156:[H25]-B1-ST300 (vacuno) y O166:H28-E-ST1819/ST1824 (vacuno y pequeños rumiantes).

3ª. Nuestros resultados identifican a los animales silvestres como reservorios de grupos clonales ECVT específicos, tales como O75:[H8]-B1-ST13, O98:[H21]-B1-ST306, y O146:[H28]-F-ST738.

4ª. Para la correcta caracterización de la estructura filogenética de *E. coli* es fundamental el uso de diferentes aproximaciones. En nuestro caso, la combinación de los datos obtenidos mediante el esquema de filogrupos de Clermont (basado en la *cuadriplex* PCR), el algoritmo Neighbor-Joining, el algoritmo eBURST, junto con el análisis de los perfiles de macrorrestricción de las cepas obtenidos mediante PFGE, nos permitió deducir las relaciones clonales de nuestra colección.

5ª. En base al análisis de sus perfiles filogenéticos, de virulencia y de macrorrestricción, los grupos clonales O26:[H11]/HNM-B1-ST21/ST29, O118:H16/HNM-B1-ST21 y O111:[H8]-B1-ST16, cuyas ST están incluidas en el ST29 Cplx, tendrían un origen clonal común, siendo el grupo clonal O111:[H8]-B1-ST16 el que habría acumulado un mayor número de eventos genéticos.

6ª. En base a los datos filogenéticos, sus perfiles de virulencia, de macrorrestricción y los datos epidemiológicos, los grupos clonales O104:H7-B1-ST1817/ST2283 y O117:HNM-B1/ST1816/ST1817 habrían tenido un origen clonal común y sufrido una diversificación genética posterior.

7ª. Los datos epidemiológicos de las cepas y sus perfiles genéticos y filogenéticos, apuntarían a un origen común de los grupos clonales O20:H19-B1-ST205/ST443 y O76:H19-B1-ST675, con una posible adaptación posterior al hospedador. El O20:H19-B1-ST205/ST443 tendría como hospedador al ganado bovino y el O76:H19-B1-ST675 a los pequeños rumiantes ovino/caprino.

8ª. En el análisis global mediante el algoritmo eBURST, el Complejo Clonal 10 en el que se predice la ST10 como genotipo fundador, es el de mayor tamaño dentro de la población de *E. coli* (con más de 1.500 ST) y en él quedan incluidas, no solo importantes linajes de ExPEC, sino también linajes de *E. coli* diarreagénicos (17 de las 41 ST del presente estudio pertenecen al CC10).



6. BIBLIOGRAFÍA



- Abe C.M., Trabulsi L.R., Blanco J., Blanco M., Dahbi G., Blanco J. E., Mora A., Franzolin M.R., Taddei C.R., Martinez M.B., Piazza R.M., Elias W.P. 2009. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 64(4):357-365.
- Ackers M.L., Mahon B.E., Leahy E., Goode B., Damrow T., Hayes P.S., Bibb W.F., Rice D.H., Barrett T.J., Hutwagner L., Griffin P.M., Slutsker L. 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis*. 177: 1588-1593.
- Adams N.L., Byrne L., Smith G.A., Elson R., Harris J.P., Salmon R., Smith R., O'Brien S.J., Adak G.K., Jenkins C. 2016. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157, England and Wales, 1983-2012. *Emerg Infect Dis*. 22(4):590-597.
- Adu-Bobie J., Frankel G., Bain C., Goncalves A.G., Trabulsi L.R., Douce G., Knutton S., Dougan G. 1998. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3): 662-668.
- AESAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. 2012. Memoria anual del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI) Año 2011., Expedientes destacados en el año 2011. Notificaciones de alerta de pepinos españoles por presencia de *E. coli* enterohemorrágico.
- Afset J.E., Anderssen E., Bruant G., Harel J., Wieler L., Bergh K. 2008. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7): 2280-2290.
- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. Dirección General de Salud Pública. Agencia de Protección de la Salud. Agencia de Salud Pública de Barcelona. 8 de junio de 2011. (http://www.gencat.cat/salut/acsa//html/es/dir3122/ecvt_catalunya_06-2011_es.pdf).
- Agustini B.C., Silva L.P., Bloch C., Jr., Bonfim T.M.B., da Silva G.A. 2014. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5645-5654.
- Ahmed A.M., Kawamoto H., Inouye K., Hashiwata Y., Sakaki M., Seno M., Shimamoto T. 2005. Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 causing a family outbreak in Japan. *J Med Microbiol*. 54:867-872.
- Ahmed R., Bopp C., Borczyk A., Kasatiya S. 1987. Phage typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis*. 155: 806-809.
- Ahmed R., Ali A., Demczuk W., Woodward D., Clark C., Khakria R., Rodgers F. 2001. Emergence of new molecular and phage typing variants of *E. coli* O157:H7 in Canada. En: Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe, 5. Epidemiology of Verocytotoxigenic *E. coli*. Concerted Action CT98-3935. Eds. Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., McDowell D.A. Teagasc, The National Food Centre, Dublin.: 123.
- Aidar-Ugrinovich L., Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Leomil L., Dahbi G., Mora A., Onuma D.L., Silveira W.D., Pestana de Castro A.F. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 297-306.
- Akiba M., Masuda T., Sameshima T., Katsuda K. 1999. Molecular typing of *Escherichia coli* O157:H7 (H-) isolates from cattle in Japan. *Epidemiol. Infect.* 122: 337-341.
- Aktan I., Sprigings K.A., La Ragione R.M., Faulkner L.M., Paiba G.A., Woodward M.J. 2004. Characterization of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. *Vet. Microbiol.* 103:43-53.
- Allerberger F., Friedrich A.W., Grif K., Dierich M.P., Dornbusch H.J., Mache C.J., Nachbaur E., Freilinger M., Rieck P., Wagner M., Caprioli A., Karch H., Zimmerhackl L.B. 2003. Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *Int J Infect Dis*. 7(1):42-45.
- Allison H.E. 2007. Stx-phages: drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiology*, 2(2): 165-174.
- Allison L.J., Stirrat A., Thomson-Carter F.M. 1998. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* O157:H7 in Scotland and its utility in strain subtyping. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 17:844-848.
- Allison L.J., Carter P.E., Thomson-Carter F.M. 2000. Characterization of a recurrent clonal type of *Escherichia coli* O157:H7 causing major outbreaks of infection in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 38:1632-1635.

- Alonso C.A., González-Barrio D., Tenorio C., Ruiz-Fons F., Torres C. 2016. Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from farmed red deer and wild small mammals. Detection of a multiresistant *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamase. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 45:34-39.
- Alonso C.A., Mora A., Díaz D., Blanco M., González-Barrio D., Ruiz-Fons F., Simón C., Blanco B., Torres C. 2017. Occurrence and characterization of and/or -positive isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar, *Veterinary Microbiology*, Volume 207, Pages 69-73.
- Alonso S., Mora A., Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., Ferreiro M.T., López C., Alberghini L., Albonetti S., Echeita A., Trevisani M., Blanco J. 2007. Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int Microbiol*. 10(2):109-116.
- Alpers K., Werber D., Frank C., Koch J., Friedrich A.W., Karch H., An DER Heiden M., Prager R., Fruth A., Bielaszewska M., Morlock G., Heissenhuber A., Diedler A., Gerber A., Ammon A. 2009. Sorbitol-fermenting enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- causes another outbreak of haemolytic uraemic syndrome in children. *Epidemiol Infect*. 137(3):389-395.
- Álvarez-Suárez M.E., Otero A., García-López M.L., Dahbi G., Blanco M., Mora A., Blanco J., Santos J.A. 2016. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *Int J Food Microbiol*. 236:148-154.
- Amaral M.M., Sacerdoti F., Jancic C., Repetto H.A., Paton A.W., Paton J.C., Ibarra C. 2013. Action of shiga toxin type-2 and subtilase cytotoxin on human microvascular endothelial cells. *Public Library Of Science one*, 8(7):70431.
- Amézquita-López B.A., Quiñones B., Cooley M.B., León-Félix J., Castro-Del Campo N., Mandrell R.E., Jiménez M., 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(12):e51565.
- Amézquita-López B.A., Quiñones B., Lee B.G., Chaidez C. 2014. Virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from domestic farm animals in Northwestern Mexico. *Front Cell Infect Microbiol*. 4:7.
- Ammon A., Petersen L.R., Karch H. 1999. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H-. *J. Infect. Dis*. 179:1274-1277.
- Anónimo. 1997. *Escherichia coli* O157 outbreak in Lincolnshire. Communicable disease report. *CDR weekly*, 7(12):101-101.
- Anónimo. 2001. Brote de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 en diferents escoles de Catalunya. *Boletín Epidemiológico de Cataluña*, 22:59-64.
- Aranda K.R., Fabbrocetti S.H., Fagundes-Neto U., Scaletsky I.C. 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol Lett*. 267(2):145-150.
- Armstrong G.L., Hollingsworth J., Morris J.G. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews*, 18(1):29-51.
- Arocha M.M., Mcvey M., Loeder S.D., Rupnow J.H., Bullerman L. 1992. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *J. Food Prot*. 55:379-381.
- Arthur T.M., Barkocy-Gallegher G.A., Rivera-Betancourt M., Koohmaraie M. 2002. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Appl. Environ. Microbiol*. 68:4847-4852.
- Arthur T.M., Bosilevac J.M., Nou X., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M. 2007. Comparison of the molecular genotypes of *Escherichia coli* O157:H7 from the hides of beef cattle in different regions of North America. *J Food Prot*. 70(7):1622-1626.
- Asakura H., Makino S., Shirahata T., Tsukamoto T., Kurazono H., Ikeda T., Takeshi K. 1998. Detection and genetical characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. *Microbiol Immunol*. 42(12):815-822.
- Aslani M.M., Bouzari S. 2009. Characterization of virulence genes of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from two provinces of Iran. *Jpn J Infect Dis*. 62(1):16-19.
- Aspán A., Eriksson E. 2010. Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from Swedish cattle; isolates from prevalence studies versus strains linked to human infections--a retrospective study. *BMC Vet Res*. 6:7.
- Asselta R., Tenchini M.L., Duga S. 2006. Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side. *J Thromb Haemost* 4: 26-34.
- Badri S., Fassouane A., Filliol I., Hassar M., Cohen N. 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat marketed in Casablanca (Morocco). *Cell Mol Biol (Noisy-legrand)*. 57 Suppl:OL1476-1477.
- Bae W.K., Lee Y.K., Cho M.S., Ma S.K., Kim S.W., Kim N.H., Choi K.C. 2006. A case of haemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4. *Yonsei Med J*. 47(3):437-439.
- Bai J., Shi X., Nagaraja T.G. 2010. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods*. 82(1):85-89.

- Bai J., Paddock Z.D., Shi X., Li S., An B., Nagaraja T.G. 2012. Applicability of a multiplex PCR to detect the seven major Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on genes that code for serogroup-specific O-antigens and major virulence factors in cattle feces. *Foodborne Pathog Dis.* 9(6):541-548.
- Bai X, Wang H, Xin Y, Wei R, Tang X, Zhao A, Sun H, Zhang W, Wang Y, Xu Y, Zhang Z, Li Q, Xu J, Xiong Y. 2015. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. *Int J Food Microbiol.* 200:31-38.
- Bai X., Hu B., Xu Y., Sun H., Zhao A., Ba P., Fu S., Fan R., Jin Y., Wang H., Guo Q., Xu X., Lu S., Xiong Y. 2016. Molecular and Phylogenetic Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in China. *Front Cell Infect Microbiol.* 6:143.
- Bamforth J. 1923. A case of symmetrical cortical necrosis of the kidneys occurring in an adult man. *J. Pathol.*, 26:40-45.
- Banatvala N., Debeukelaer M.M., Griffin P.M., Barrett T.J., Greene K.D., Green J.H., Wells J.G. 1996. Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O111 and associated hemolytic-uremic syndrome: A family outbreak. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 15(11):1008-1011.
- Banatvala N., Griffin P.M., Greene K.D., Barrett T.J., Bibb W.F., Green J.H., Wells J.G., the Hemolytic Uremic Syndrome Study Collaborators. 2001. The United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J. Infect. Dis.* 183:1063-1070.
- Barkocy-Gallagher G.A., Arthur T.M., Rivera-Betancourt M., Nou X., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M. 2003. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *J. Food. Prot.* 66:1978-1986.
- Barret A.S., Charron M., Mariani-Kurkdjian P., Gouali M., Loukiadis E., Poignet-Leroux B., Godron A., Gault G., Faure M., Mailles A.; group of investigators. 2012. Shopper cards data and storage practices for the investigation of an outbreak of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 infections. *Med Mal Infect.* 43(9):368-373.
- Barrett T.J., Kaper J.B., Jerse A.E., Wachsmuth I.K. 1992. Virulence factors in Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *Journal of Infectious Diseases*, 165(5):979-980.
- Barrett T.J., Lior H., Green J.H., Khakhria R., Wells J.G., Bell B.P., Greene K.D., Lewis J., Griffin P.M. 1994. Laboratory investigation of a multi-state food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 32:3013-3017.
- Barrett T.J., Gerner-Smidt P., Swaminathan B. 2006. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog Dis.* 3(1):20-31.
- Barth S.A., Menge C., Eichhorn I., Semmler T., Wieler L.H., Pickard D., Belka A., Berens C., Geue L. 2016. The Accessory Genome of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Defines a Persistent Colonization Type in Cattle. *Appl Environ Microbiol.* 82(17):5455-5464.
- Bastian S.N., Carle I., Grimont F. 1998. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 149(7):457-472.
- Beaudry M., Zhu C., Fairbrother J.M., y Harel J. 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(1): 144-148.
- Bekal S., Brousseau R., Masson L., Prefontaine G., Fairbrother J., Harel J. 2003. Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays. *J. Clin. Microbiol.* 41:2113-2125.
- Bell B.P., Goldoft M., Griffin P.M., Davis M.A., Gordon D.C., Tarr P.I., Bartleson C.A., Lewis J.H., Barrett T.J., Wells J.G., Baron R., Kobayashi J. 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli*-O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic-uremic-syndrome from hamburgers -The Washington experience. *JAMA-Journal of the American Medical Association*, 272(17):1349-1353.
- Belnap W.D, O'Donnell J.J. 1955. Epidemic gastroenteritis due to *Escherichia coli* 0-111; a review of the literature, with the epidemiology, bacteriology, and clinical findings of a large outbreak. *J Pediatr.* 47(2):178-193.
- Benenson A.S. (Ed.), 1995. Control of Communicable Diseases Manual 1995, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Besser R.E., Lett S.M., Weber J.T., Doyle M.P., Barrett T.J., Wells J.G., Griffin P.M. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh pressed apple cider. *JAMA* 269:2217-2220.
- Besser T.E., Hancock D.D., Pritchett L.C., McRae E.M., Rice D.H., Tarr P.I. 1997. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Infect Dis.* 175(3):726-729.
- Bettelheim K.A. 2000. Role of non-O157 VTEC. *J. Appl. Microbiol.* 88:38S-50S.
- Bettelheim K.A. 2003. Non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli*: A problem, paradox, and paradigm. *Exp.Biol. Med.* 228:333-344.
- Bettelheim K.A. 2007. The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol.* 33(1):67-87. Review.

- Bettelheim K.A., Wilson M.W. 1982. The enterotoxigenicity of strains of *Escherichia coli* isolated from the faeces of healthy people and cattle. *J Hyg (Lond)*. 88(1):121-123.
- Bettelheim K.A., Hornitzky M.A., Djordjevic S.P. 2001. First bovine and ovine isolations of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 in Australia. *Aust Vet J*. 79(4):289-290.
- Beutin L. 1999. *Escherichia coli* O157 and other types of verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) isolated from humans, animals and food in Germany. In *Escherichia coli* O157 in farm animals. (C.S. Stewart and H.J. Flint, Eds.) CABI Publishing, Wallingford, UK. 121-145.
- Beutin L. 2006. Emerging enterohemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*. 53:299-305. Review.
- Beutin L., Strauch E. 2007. Identification of sequence diversity in the *Escherichia coli* fliC genes encoding flagellar types H8 and H40 and its use in typing of Shiga toxin-producing *E. coli* O8, O22, O111, O174, and O179 strains. *J Clin Microbiol*. 45(2):333-339.
- Beutin L., Prada J., Zimmermann S., Stephan R., Orskov I., Orskov F. 1988. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Zbl. Bakt. Hyg. A*. 267:576-588.
- Beutin L., Montenegro M.A., Orskov I., Orskov F., Prada J., Zimmermann S., Stephan R. 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 27(11):2559-2564.
- Beutin L., Geier D., Steinruck H., Zimmermann S., Scheutz F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in 7 different species of healthy domestic-animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(9):2483-2488.
- Beutin L., Aleksic S., Zimmermann S., Gleier K. 1994. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med Microbiol Immunol*. 183(1):13-21.
- Beutin L., Geier D., Zimmermann S., Karch H. 1995. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic-animals of different species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3):631-635.
- Beutin L., Zimmermann S., Gleier K. 1996a. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J. Clin. Microbiol*. 34: 2812-2814.
- Beutin L., S. Zimmermann und K. Gleier. 1996b. Zur Epidemiologie und Diagnostik von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland. Mikrobiologisch nachgewiesene Fälle von Infektionen durch EHEC bei Menschen in den Jahren 1993 bis 1995. *Bundesgesundheitsbl*. 39: 326-331
- Beutin L., Geier D., Zimmermann S., Aleksic S., Gillespie H.A., Whittam T.S. 1997a. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol*. 63(6):2175-2180.
- Beutin L., Horbach I., Zimmermann S., Gleier K. 1997b. Comparative evaluation of different diagnostic methods for the detection of verotoxin (Shiga-toxin) producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) in human clinical stool specimens. *J. Lab. Med*. 21 (10):537-546.
- Beutin L., Zimmermann S., Gleier K. 1998. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerg Infect Dis*. 4(4):635-639.
- Beutin L., Kaulfuss S., Cheasty T., Brandenburg B., Zimmermann S., Gleier K., Willshaw G.A., Smith H.R. 2002a. Characteristics and association with disease of two major subclones of Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing strains of *Escherichia coli* (STEC) O157 that are present among isolates from patients in Germany. *Diag. Microbiol. Infect. Dis*. 44:337-346.
- Beutin L., Zimmermann S., Gleier K. 2002b. Evaluation of the VTEC-screen "seiken" test for detection of different types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli*. *Diag Microbiol Infect Dis* 42:1-8.
- Beutin L., Bülte M., Weber A., Zimmermann S., Gleier K. 2000c. Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. *Epidemiol Infect*. 125(1):47-54.
- Beutin L., Krause G., Zimmermann S., Gleier K., Kaulfuss S., Schmidt H. 2003. Characterization of 677 verotoxin (Shiga toxin)-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from patients in Germany between 1997 and 1999 by their serotypes and their virulence markers. 5th International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* infections". Edinburgh.
- Beutin L., Krause G., Zimmermann S., Kaulfuss S., Gleier K. 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol*42:1099-1108.
- Beutin L., Kaulfuss S., Herold S., Oswald E., Schmidt H. 2005a. Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*.43(4):1552-1563. Erratum in: *J Clin Microbiol*. 2006 Feb;44(2):679.
- Beutin L., Kong Q., Feng L., Wang Q., Krause G., Leomil L., Jin Q., Wang L. 2005b. Development of PCR assays targeting the genes involved in synthesis and assembly of the new *Escherichia*

- coli* O 174 and O 177 O antigens. *J Clin Microbiol.* 43(10):5143-5149.
- Beutin L., Tao J., Feng L., Krause G., Zimmermann S., Gleier K., Xia Q., Wang L. 2005c. Sequence analysis of the *Escherichia coli* O15 antigen gene cluster and development of a PCR assay for rapid detection of intestinal and extraintestinal pathogenic *E. coli* O15 strains. *J Clin Microbiol.* 43(2):703-710.
- Beutin L., Miko A., Krause G., Pries K., Haby S., Steege K., 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(15):4769-4775.
- Beutin L., Delannoy S., Fach P. 2015a. Genetic Diversity of the *fliC* Genes Encoding the Flagellar Antigen H19 of *Escherichia coli* and Application to the Specific Identification of Enterohemorrhagic *E. coli* O121:H19. *Appl Environ Microbiol.* 81(12):4224-4230.
- Beutin L., Delannoy S., Fach P. 2015b. Sequence Variations in the Flagellar Antigen Genes *fliCH25* and *fliCH28* of *Escherichia coli* and Their Use in Identification and Characterization of Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O145:H25 and O145:H28. *PLoS One.* 10(5):e0126749.
- Bibbal D., Loukiadis E., Kérourédan M., Ferré F., Dilasser F., Peytavin de Garam C., Cartier P., Oswald E., Gay E., Auvray F., Brugère H. 2015. Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl Environ Microbiol.* 81(4):1397-1405.
- Bidet P., Mariani-Kurkdjian P., Grimont F., Brahimi N., Courroux C., Grimont P., Bingen E. 2005. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. *J Med Microbiol.* 54:71-75.
- Bielaszewska M., Karch H. 2000. Non-O157:H7 Shiga toxin verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains: epidemiological significance and microbiological diagnosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16:711-718.
- Bielaszewska M., Janda J., Blahová K., Feber J., Potuzník V., Součková A. 1996. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in children with hemolytic uraemic syndrome in the Czech Republic. *Clin Nephrol.* 46(1):42-44.
- Bielaszewska M., Janda J., Blahova K., Minarikova H., Jikova E., Karmali M.A., Laubova J., Sikulova J., Preston M.A., Khakhria R., Karch H., Klazarova H., Nyc O. 1997. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect.* 119:299-305.
- Bielaszewska M., Tarr P.I., Karch H., Zhang W., Mathys W. 2005. Phenotypic and molecular analysis of tellurite resistance among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and sorbitol-fermenting O157:NM clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 43:452-454.
- Bielaszewska M., Friedrich A.W., Aldick T., Schürk-Bulgrin R., Karch H. 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 43(9):1160-1167.
- Bielaszewska M., Kock R., Friedrich A.W., von Eiff C., Zimmerhackl L.B., Karch H., Mellmann A. 2007a. Shiga toxin-mediated hemolytic uraemic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS One* 2:e1024.
- Bielaszewska M., Prager R., Köck R., Mellmann A., Zhang W., Tschäpe H, Tarr PI, Karch H. 2007b. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol.* 73(10):3144-3150.
- Bielaszewska M., Middendorf B., Köck R., Friedrich A.W., Fruth A., Karch H., Schmidt M.A., Mellmann A. 2008. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. *Clin. Infect. Dis.* 47:208-217.
- Bielaszewska M., Stoeve F., Fruth A., Zhang W., Prager R., Brockmeyer J., Mellmann A., Karch H., Friedrich A.W. 2009. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *J Clin Microbiol.* 47(7):2061-2066.
- Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Koeck R., Fruth A., Bauwens A., Peters G., Karch H. 2011a. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infectious Diseases,* 11(9):671-676.
- Bielaszewska M., Middendorf B., Tarr P.I., Zhang W., Prager R., Aldick T., Dobrindt U., Karch H., Mellmann A. 2011b. Chromosomal instability in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: impact on adherence, tellurite resistance and colony phenotype. *Mol Microbiol.* 79(4):1024-1044.
- Bielaszewska M., Mellmann A., Bletz S., Zhang W., Köck R., Kossow A., Prager R., Fruth A., Orth-Höller D., Marejková M., Morabito S., Caprioli A., Piérard D., Smith G., Jenkins C., Curová K., Karch H. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis.* 56(10):1373-1381.
- Blanco J. 2012. Stx2a-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4-ST678. Microbiological diagnostic already, for this and other STEC/VTEC serotypes. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 30(2):84-89.
- Blanco J. y Blanco M. 1993. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigenicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Lugo (Galicia) España.
- Blanco J., González E.A., Bernárdez I., Regueiro B. 1983. Differentiated biological activity of Vero cytotoxins (VT)

- released by human and porcine *Escherichia coli* strains. FEMS Microbiol. Lett. 20:167-170.
- Blanco J., González E.A., García S., Blanco M., Regueiro B., Bernárdez I. 1988. Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (north-western Spain). Vet Microbiol. 18(3-4):297-311.
- Blanco J., Alonso M.P., Blanco M., y González E.A. 1991. Pathogenetic mechanisms of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 9(10): 640-651.
- Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Alonso M.P., Garabal J.I., González E.A. 1993a. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Servicio de Publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo: pp. 361.
- Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Alonso M.P., Escribano A. 1993b. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por los *Escherichia coli* enterohemorrágicos productores de verotoxinas. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 11(6):324-334.
- Blanco J., Blanco M., Wong I., Blanco J.E. 1993c. Haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from stools of healthy cats produce cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). Vet Microbiol. 38(1-2):157-165.
- Blanco J., Blanco M., Escribano A., Blanco J., Alonso M., Marín J., Hernández R. 1995. *Escherichia coli* verotoxigénicos y el síndrome urémico hemolítico. Aspectos clínicos y microbiológicos. Anales Españoles de Pediatría, 42:95-106.
- Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I. 2001. Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. En: Verocytotoxigenic *E. coli*. Eds. Duffy G., Garvey P., McDowell A. Food and Nutrition Press. EE.UU., pp 113-148.
- Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I. 2002. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. En: Manual de Microbiología Veterinaria. Eds. Vadillo S., Píriz S Mateos E. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 301-325.
- Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., González E.A., Bernárdez M.I., Alonso M.P., Coira A., Rodríguez A., Rey J., Alonso J.M., Usera M.A. 2003. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. Exp Biol Med (Maywood). 228(4):345-351.
- Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Mora A., Balaguer L., Mourinho M., Juárez A., Jansen W.H. 1996a. O serogroups, biotypes, and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. J Clin Microbiol. 34(12):3101-3107.
- Blanco J.E., Blanco M., Mora A., Rio M., Santísima Trinidad B., Prado C., Fernández L., y Blanco J. 1996b. *Escherichia coli* necrotoxigénicos (ECNT) CNF1⁺ y CNF2⁺ como indicadores de la contaminación microbiana de los alimentos. Alimentaria 275: 79-85.
- Blanco J.E., Blanco M., Molinero M.E., Peiró E., Mora A., Blanco J. 1996c. Brote de gastroenteritis asociado con un *Escherichia coli* verotoxigénico (ECVT) O111:H- VT1+eae+. Alimentaria. 275:110-113.
- Blanco J.E., Blanco M., Gutiérrez A., Prado C., Rio M., Fernández L., Fernández M.J., Sainz V., Blanco J. 1996d. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation. Microbiologia SEM. 12:385-394.
- Blanco J.E., Blanco M., Alonso M.P., Mora A., Dahbi G., Coira M.A., Blanco J. 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. J Clin Microbiol. 42(1):311-319.
- Blanco M., Blanco J., Blanco J.E., González E.A., Gomes T.A.T., Zerbini L.F., Yano T., y Decastro A.F.P. 1994. Genes-coding for Shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging to different O-K-H serotypes. Veterinary Microbiology, 42(2-3): 105-110.
- Blanco M., Blanco J.E., Blanco J., Gonzalez E.A., Mora A., Prado C., Fernández L., Rio M., Ramos J., Alonso M.P. 1996. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. Epidemiol Infect. 117(2):251-257.
- Blanco M., Blanco J.E., Alonso M.P., Mora A., Balsalobre C., Muñoa F., Juárez A., Blanco J. 1997a. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. Res Microbiol. 148(9):745-755.
- Blanco M., Blanco J.E., Gonzalez E.A., Mora A., Jansen W., Gomes T.A., Zerbini L.F., Yano T., de Castro A.F., Blanco J. 1997b. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. J Clin Microbiol. 35(11):2958-2963.
- Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Blaaguer L., Blanco J. 1997c. *Escherichia coli* enteropatógenos (ECEP) para conejos: mecanismos de patogénesis, serobiotipos, quimioterapia y vacunación. Medicina Veterinaria, 14: 133-144.
- Blanco M., Blanco J.E., Blanco J., Mora A., Prado C., Alonso M.P., Mourinho M., Madrid C., Balsalobre C., Juárez A. 1997d. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. Vet. Microbiol. 54:309-319.
- Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Dhahi G., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I., Blanco J. 2003a. Typing of eae,

- tir, esp A, esp B and esp D genes of LEE pathogenicity island of VTEC and EPEC: intimin types. 5th International Symposium on "Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* infections". Edinburgh. Final programme and Book of Abstracts, p47 abstract, 114.
- Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Rey J., Alonso J.M., Hermoso M., Hermoso J., Alonso M.P., Dahbi G., González E.A., Bernárdez M.I., Blanco J. 2003b. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J Clin Microbiol.* 41(4):1351-1356.
- Blanco M., Blanco J.E., Blanco J., de Carvalho V.M., Lopes D., Pestana de Castro A.F. 2004a. Typing of intimin (eae) genes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains from monkeys. *J. Clin. Microbiol.* 42:1382-1383.
- Blanco M., Padola N.L., Krüger A., Sanz M.E., Blanco J.E., González E.A., Dahbi G., Mora A., Bernárdez M.I., Etcheverría A.L., Arroyo G.H., Lucchesi P.M.A., Parma A.E., Blanco J. 2004b. Virulence genes and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from cattle in Argentina. *Int. Microbiol.* 7:269-276.
- Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Dahbi G., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I., Blanco J. 2004c. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). *J Clin Microbiol.* 42(2):645-651.
- Blanco M., Blanco J.E., Pita J.M., da Silva D., Mora A., Dahbi G., Justel P., Alonso M.P., Coira M.A., Echeita M.A., y Blanco J. 2004d. Prevalencia, serotipos genes de virulencia, tipos de intiminas, perfiles de PFGE y fagotipos de *Escherichia coli* verotoxigénicos en coprocultivos (2003). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(1):185.
- Blanco M., Schumacher S., Tasara T., Zweifel C., Blanco J.E., Dahbi G., Blanco J., Stephan R. 2005. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-eta 2*). *BMC Microbiology*, 5(1):23.
- Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., Alonso M.P., Mora A., Coira M.A., Madrid C., Juarez A., Bernárdez M.I., González E.A., Blanco J. 2006a. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *International Microbiology*, 9(2):103-110.
- Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., Mora A., Alonso M.P., Varela G., Gadea M.P., Schelotto F., González E.A., Blanco J. 2006b. Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (μ B and ξ R/ β 2B). *Journal of Medical Microbiology*, 55(9):1165-1174.
- Bletz S., Bielaszewska M., Leopold S.R., Köck R., Witten A., Schuldes J., Zhang W., Karch H., Mellmann A. 2013. Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 based on single-nucleotide polymorphisms. *Genome Biol Evol.* 5(10):1807-1816.
- Bockemuhl J., Aleksic S., Karch H. 1992. Serological and biochemical properties of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing strains of *Escherichia coli*, other than O-group 157, from patients in Germany. *Zentbl Bakteriol Parasitenkd Infekctcankh Nyg Abt 1 Orig.* 276:189-195.
- Boczek L.A., Johnson C.H., Rice E.W., Kinkle B.K. 2006. The widespread occurrence of the enterohemolysin gene ehlyA among environmental strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 254(2):281-284.
- Boerlin P., McEwen S.A., Boerlin-Petzold F., Wilson J.B., Johnson R.P., Gyles C.L. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol.* 37(3):497-503.
- Böhm H., Karch H. 1992. DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 30:2169-2172.
- Boisen N., Scheutz F., Rasko D.A., Redman J.C., Persson S., Simon J., Kotloff K.L., Levine M.M., Sow S., Tamboura B., Toure A., Malle D., Panchalingam S., Krogfelt K.A., Nataro J.P. 2012. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *J Infect Dis.* 205(3):431-444.
- Bokete T.N., Whittam T.S., Wilson R.A., Clausen C.R., O'Callahan C.M., Moseley S.L., Fritsche T.R., Tarr P.I. 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. *J Infect Dis* 175:1382-1389.
- Bolduc D., Srour L.F., Sweet L., Neatby A., Galanis E., Isaacs S., Lim G. 2004. Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002. *Canada communicable disease report* 30(9):81-88.
- Bonardi S., Maggi E., Bottarelli A., Pacciarini M.L., Ansuini A., Vellini G., Morabito S., Caprioli A. 1999. Isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. *Vet Microbiol.* 67(3):203-211.
- Bonardi S., Maggi E., Pizzin G., Morabito, Caprioli A. 2001. Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 66:47-53.
- Bonardi S., Brindani F., Pizzin G., Lucidi L., D'Incau M., Liebana E., Morabito S. 2003. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2):101-110.
- Bonardi S., Alpighiani I., Tozzoli R., Vismarra A., Zecca V., Greppi C., Bacci C., Bruini I., Brindani F. 2015. Shiga toxin-

producing *Escherichia coli* O157, O26 and O111 in cattle faeces and hides in Italy. *Vet Rec Open*. 2(1):e000061.

Bonnet R., Souweine B., Gauthier G., Rich C., Livrelli V., Sirot J., Joly B., Forestier C. 1998. Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J Clin Microbiol*. 36(6):1777-1780.

Bopp D.J., Sauders B.D., Waring A.L., Ackelsberg J., Dumas N., Braun-Howland E., Dziejwski D., Wallace B.J., Kelly M., Halse T., Musser K.A., Smith P.F., Morse D.L., Limberger R.J. 2003. Detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *J Clin Microbiol*. 41(1):174-180.

Borczyk A.A., Karmali M.A., Lior H., Duncan L.M.C. 1987. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* i: 98.

Boric V. 2008. Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Avances en Latinoamérica. Bio- farbo*. 16:92-97.

Bosilevac J.M., Koohmaraie M. 2011. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6):2103-2112.

Bosilevac J.M. Koohmaraie M. 2012. Predicting the presence of non-o157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef by using molecular tests for Shiga toxins, intimin, and o serogroups. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19):7152-7155.

Bradley K.K., Williams J.M., Burnsed L.J., Lytle M.B., McDermott M.D., Mody R.K., Bhattarai A., Mallonee S., Piercefield E.W., McDonald-Hamm C.K., Smithee L.K. 2012. Epidemiology of a large restaurant-associated outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:NM. *Epidemiol Infect*. 140(9):1644-1654.

Brandal L.T., Wester A.L., Lange H., Løbersli I., Lindstedt B.A., Vold L., Kapperud G. 2015. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Norway, 1992-2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. *BMC Infect Dis*. 15:324.

Brandt J.R., Fouser L.S., Watkins S.L., Zelikovic I., Tarr P.I., Nazarstewart V., Avner E.D. 1994. *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. *Journal of Pediatrics*, 125(4):519-526.

Bray J. 1945. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bacterium coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. *J of Pathol Bacteriol*. 57(2):239-247.

Brett K.N., Ramachandran V., Hornitzky M.A., Bettelheim K.A., Walker M.J., Djordjevic S.P. 2003. stx1c is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia*

coli isolates from sheep but not among isolates from cattle. *J Clin Microbiol*. 41(3):926-936.

Brockmeyer J., Bielaszewska M., Fruth A., Bonn M.L., Mellmann A., Humpf H.U., Karch H. 2007. Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: distribution, secretion, and proteolytic activity. *Appl Environ Microbiol*.;73(20):6351-6359.

Brooks J.T., Bergmire-Sweat D., Kennedy M., Hendricks K., García M., Marengo L., Wells J., Ying M., Bibb W., Griffin P.M., Hoekstra R.M., Friedman C.R. 2004. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H8 infections among attendees of a high school cheerleading camp. *Clin. Infect. Dis*. 38:190-198.

Brooks J.T., Sowers E.G., Wells J.G., Greene K.D., Griffin P.M., Hoekstra R.M., Strockbine N.A. 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis*. 192(8):1422-1429.

Brown J.A., Hite D.S., Gillim-Ross L.A., Maguire H.F., Bennett J.K., Patterson J.J., Comstock N.A., Watkins A.K., Ghosh T.S., Vogt R.L. 2012. Outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11 infection at a child care center in Colorado. *Pediatr Infect Dis J*. 31(4):379-383.

Bruce M.G., Curtis M.B., Payne M.M., Gautom R.K., Thompson E.C., Bennett A.L., Kobayashi J.M. 2003. Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Clark County, Washington, August 1999. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 157(10):1016-1021.

Brunder W., Schmidt H., Karch H. 1996. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*. 142 (Pt 11):3305-3315.

Brunder W., Schmidt H., Karch H. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol*. 24:767-778.

Brunder W., Schmidt H., Frosch M., Karch H. 1999. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology*. 145 (Pt 5):1005-1014.

Bruneau A., Rodrigue H., Ismaël J., Dion R., Allard R. 2004. Outbreak of *E. coli* O157:H7 associated with bathing at a public beach in the Montreal-Centre region. *Can Commun Dis Rep*. 30(15):133-136.

Bugarel M., Beutin L., Martin A., Gill A., Fach P. 2010. Microarray 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.

Bürk C., Dietrich R., Açar G., Moravek M., Bülte M., Märtlbauer E. 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga

- toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.* 41:2106–2112
- Burland V., Shao Y., Perna N.T., Plunkett G., Sofia H.J., Blattner F.R. 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.* 26:4196–4204
- Bustamante A.V., Sanso A.M., Lucchesi P.M., Parma A.E. 2011. Multiplex PCR assay for the detection of five putative virulence genes encoded in verotoxigenic *Escherichia coli* plasmids. *Curr Microbiol.* 62(5):1411–1415.
- Butcher H., Elson R., Chattaway M.A., Featherstone C.A., Willis C., Jorgensen F., Dallman T.J., Jenkins C., McLAUCHLIN J., Beck C.R., Harrison S. 2016. Whole genome sequencing improved case ascertainment in an outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with raw drinking milk. *Epidemiol Infect.* 144(13):2812–2823.
- Buvens G., Possé B., De Schrijver K., De Zutter L., Lauwers S., Piérard D. 2011. Virulence profiling and quantification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O145:H28 and O26:H11 isolated during an ice cream-related hemolytic uremic syndrome outbreak. *Foodborne Pathog Dis.* 8(3):421–426.
- Buvens G., De Gheldre Y., Dediste A., de Moreau A.I., Mascart G., Simon A., Allemeersch D., Scheutz F., Lauwers S., Piérard D. 2012. Incidence and virulence determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections in the Brussels-Capital Region, Belgium, in 2008–2010. *J Clin Microbiol.* 50(4):1336–1345.
- Buvens G., De Rauw K., Roisin S., Vanfraechem G., Denis O., Jacobs F., Scheutz F., Piérard D. 2013. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O128ab:H2 bacteremia in a 27-year-old male with hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 51(5):1633–1635.
- Byrne L., Jenkins C., Launders N., Elson R., Adak G.K. 2015. The epidemiology, microbiology and clinical impact of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in England, 2009–2012. *Epidemiology and Infection*, 29:1–13.
- Cahoon F.E., Thompson J.S. 1987. Frequency of *Escherichia coli* O157:H7 isolation from stool specimens. *Can J Microbiol.* 33(10):914–915.
- Calderaro A., Arcangeletti M.C., Rodighiero I., Buttrini M., Gorrini C., Motta F., Germini D., Medici M.C., Chezzi C., De Conto F. 2014. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci. Rep.* 4:6803.
- Caprioli A., Tozzi A.E. 1998. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Continental Europe. En: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strain. Eds. Kaper J.B. O'Brien A.D. ASM, Washington DC. pp. 38–48
- Caprioli A., Nigrelli A., Gatti R., Zavarella M., Blando A.M., Minelli F., Donelli G. 1993. Characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. *Vet Rec.* 133(13):323–324.
- Caprioli A., Luzzi I., Rosmini F., Resti C., Edefonti A., Perfumo F., Farina C., Goglio A., Gianviti A., Rizzoni G. 1994. Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 169(1):208–211.
- Caprioli A., Tozzi A.E., Rizzoni G., Karch H. 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg Infect Dis.* 3(4):578–579.
- Caprioli A., Morabito S., Minelli F., Marziano M.L., Goriotti S., Pichiorri T., Tozzi A.E. 2001. From Italy. VTEC infections, 1988–2000. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità.* V14: S1.
- Caprioli A., Morabito S., Brugère H., Oswald E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res.* 36(3):289–311. Review.
- Carroll A.M., Gibson A., McNamara E.B. 2005. Laboratory-based surveillance of human verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in the Republic of Ireland, 2002–2004. *J Med Microbiol.* 54(Pt 12):1163–1169.
- Carter A.O., Borczyk A.A., Carison J.A.K., Harvey B., Hockin J.C., Karmali M.A., Krishnan C., Korn D.A., Lior H. 1987. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N. Engl. J. Med.* 24:1496–1500.
- Carter M.Q., Quinones B., He X., Zhong W., Louie J.W., Lee B.G., Yambao J.C., Mandrell R.E., Cooley M.B. 2015. An Environmental Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O145 Clonal Population Exhibits High-Level Phenotypic Variation That Includes Virulence Traits. *Appl Environ Microbiol.* 82(4):1090–1101.
- Carvalho V. M., Gyles C. L., Ziebell K., Ribeiro M.A., Catão-Dias J. L., Sinhorini I. L., Otman J., Keller R., Trabulsi L. R., y Pestana de Castro A.F. 2003. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3): 1225–1234.
- Caugant D.A., Bøvre K., Gaustad P., Bryn K., Holten E., Høiby E.A., Frøholm L.O. 1986. Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J Gen Microbiol.* 132(3):641–652.
- Cebula T.A., Payne W.L., Feng P. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:248–250.

- Celli J., Deng W., Finlay B.B. 2000. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol* 2(1):1-9.
- Cerqueira A.M.F., Tibana A., Guth B.E.C. 1997. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. *J Food Prot* 60, 177-180.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 1995a. Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM—South Australia 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 44(29):550-551, 557-558.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 1995b. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21 - Helena Montana, 1994. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 44,501-503.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 1997a. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts. Michigan and Virginia, June-July 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 46:741-744.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 1997b. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider--Connecticut and New York, October 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 46(1):4-8.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2000a. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds--Wisconsin, June 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 49(40):911-913.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 associated with petting zoos--North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 54(50):1277-1280.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2006. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach--United States, September 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 55(38):1045-1046.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with drinking raw milk--Washington and Oregon, November-December 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 56(8):165-167.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection associated with a day camp petting zoo--Pinellas County, Florida, May-June 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 58(16):426-428.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Two multistate outbreaks of Shiga toxin--producing *Escherichia coli* infections linked to beef from a single slaughter facility - United States, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 59(18):557-560.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2011a. Investigation Announcement: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Lebanon Bologna. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. (http://www.cdc.gov/ecoli/2011/O157_0311/index.html).
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2011b. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with In-shell Hazelnuts. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. (<http://www.cdc.gov/ecoli/2011/hazelnuts0157/index.html>).
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2012a. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 infections associated with a correctional facility dairy - Colorado, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 61(9):149-152.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2012b. Notes from the field: *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis associated with a State Fair - North Carolina, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 60(51-52):1745-1746.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2012c. Multistate Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26 Infections Linked to Raw Clover Sprouts at Jimmy John's Restaurants (Final Update). Available online at: <http://www.cdc.gov/ecoli/2012/o26-02-12/index.html> (Accessed March, 2014).
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Foodborne Outbreak Online Database (FOOD). (<http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>).
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ground Beef (Final Update). Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O157H7-05-14/>.
- Chalmers R.M., Salmon R.L., Willshaw G.A., Cheasty T., Looker N., Davies I., Wray C. 1997. Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses. *Lancet*. 349(9068):1816.
- Chandran A., Mazumder A. 2014. Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various avian hosts in British Columbia, Canada. *Appl Environ Microbiol.* 80(6):1933-1940.
- Chapman P.A., Wright D.J., Higgins. 1993. Untreated milk as a source of verotoxigenic *E. coli* O157. *Vet. Rec.* 133:171-172.
- Chapman P.A., Siddons C.A., Gerdan Malo A.T., Harkin M.A. 1997. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect.* 119:245-250.

- Chapman P.A., Cornell J., Green C. 2000a. Infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 during a visit to an inner city open farm. *Epidemiol Infect.* 125(3):531-536.
- Chapman P.A., Siddons C.A., Cerdan Malo A.T., Harkin M.A. 2000b. A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. *Epidemiol Infect.* 124(2):207-213.
- Charatan F. 1999. New York outbreak of E coli poisoning affects 1000 and kills two. *British Medical Journal*, 319(7214):873-873.
- 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. *Nat Rev Microbiol* 6:904-912.
- Chaudhuri R.R. y Henderson I.R. 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect, Genet and Evol* 12, 214-226.
- Chauret C. 2011. Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water. *Virulence.* 2(6):593-601.
- Cheasty T., Allerberger F., Beutin L., Caprioli A., Heuvelink A., Karch H., Lofdahl S., Piérard D., Scheutz F., Siitonen A., Smith H. 2000. VTEC O157 phage types isolated from 15 European countries: 1997-1999. 4th International Symposium and Workshop on "Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections". October 29-November 2. Kyoto, Japan.
- Chen S., Zhao S., McDermott P.F., Schroeder C.M., White D.G., Meng J. 2005. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Probes* 19:195-201.
- China B., Jacquemin E., Dervin A.C., Pirson V., Mainil J. 1999. Heterogeneity of the *eae* genes in attaching and effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. *Res Microbiol.* 150:232-332.
- Chinen I., Tanaro J.D., Miliwebsky E., Lound L.H., Chillemi G., Ledri S., Baschkier A., Scarpin M., Manfredi E., Rivas M. 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot.* 64(9):1346-1351.
- Chinen I., Otero J.L., Miliwebsky E.S., Roldan M.L., Baschkier A., Chillemi G.M., Noboli C., Frizzo L., Rivas M. 2003. Isolation and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from calves in Argentina. *Research in Veterinary Science*, 74(3):283-286.
- Chinen I., Epszteyn S., Melamed C.L., Aguerre L., Martínez Espinosa E., Motter M.M., Baschkier A., Manfredi E., Miliwebsky E., Rivas M. 2009. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *Int J Food Microbiol.* 132(2-3):167-171.
- Chizhikov V., Rasooly A., Chumakov K., Levy D.D. 2001. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3258-3263.
- Cid D., Ruiz-Santa-Quiteria, Marín I., Sanz R., Orden J.A., Amils R., de la Fuente R. 2001. Association between intimin (*eae*) and EspB gene subtypes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic lambs and goat kids. *Microbiology.* 147:2341-2353.
- Cizek A., Alexa P., Smola J. 1999. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle and rats from a large-scale farm. Abstracts of the Second International Symposium of the European Study Group on Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Acta Clinica Belgica.* 54:47.
- Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 26(3):547-603. Review.
- Claydon M.A., Davey S.N., Edwards-Jones V., Gordon D.B. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 14:1584-1586.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66:4555-4558.
- Clermont O., Gordon DM, Brisse S, Walk ST, Denamur E. 2011. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environ Microbiol* 13:2468 2477.
- Clermont O., Christenson J. K., Denamur E., Gordon D.M. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 5(1):58-65.
- Clermont O., Gordon D., Denamur E. 2015. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology* 161, 980-988.
- Cody S.H., Glynn M.K., Farrar J.A. 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann. Int. Med.* 130:202-209.
- Coia J.E., Johnston Y., Steers N.J., Hanson M.F. 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *Int. J. Food Microbiol.* 66:63-69.
- Como-Sabeti K., Reagan S., Allaire S., Parrott K., Simonds C., Hrabowy S., Ritter B., Hall, W., Altamirano, J., Martin, R. 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, June-July 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 46:741-744.
- Conedera G., Dalvit P., Martini M., Galiero G., Gramaglia M., Goffredo E., Loffredo G., Marabito S., Ottaviani D., Paterlini F.,

- Pezzotti G., Pisanu M., Semprini P., Caprioli A. 2004. Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 96:67-73.
- Conedera G., Mattiazzi E., Russo F., Chiesa E., Scorzato I., Grandesso S., Bessegato A., Fioravanti A., Caprioli A. 2007. A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami. *Epidemiol Infect.* 135(2):311-314.
- Cookson A.L., Taylor S.C., Bennett J., Thomson-Carter F., Attwood G.T. 2006a. Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. *N Z Vet J* 54:78-84.
- Cookson A.L., Croucher D., Pope C., Bennett J., Thomson-Carter F., and Attwood G.T. 2006b. Isolation, characterization, and epidemiological assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O84 isolates from New Zealand. *J. Clin. Microbiol.* 44:1863-1866.
- Cookson A.L., Bennett J., Thomson-Carter F., Attwood G.T. 2007. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (ehxA) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. *Appl Environ Microbiol.* 73(20):6360-6369.
- Cooley M., Carychao D., Crawford-Mikszta L., Jay M.T., Myers C., Rose C., Keys C., Farrar J., Mandrell R.E. 2007. Incidence and tracking of *Escherichia coli* O157:H7 in a major produce production region in California. *PLoS One.* 2(11):e1159.
- Coombs B.K., Wickham M.E., Mascarenhas M., Gruenheid S., Finlay B.B., Karmali M.A. 2008. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* 74(7):2153-2160.
- Coombs B.K., Gilmour M.W., Goodman C.D. 2011. The evolution of virulence in non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2:90.
- Cooper K.K., Mandrell R.E., Louie J.W., Korlach J., Clark T.A., Parker C.T., Huynh S., Chain P.S., Ahmed S., Carter M.Q. 2014. Comparative genomics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 demonstrates a common evolutionary lineage with *Escherichia coli* O157:H7. *BMC Genomics* 15:17.
- Cortés C., De la Fuente R., Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Dhahi G., Mora A., Justel P., Contreras A., Sánchez A., Corrales J.C., Orden J.A. 2005. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Vet Microbiol.* 110(1-2):67-76.
- Couturier M.R., Lee B., Zelyas N., Chui L. 2011. Shiga-toxigenic *Escherichia coli* detection in stool samples screened for viral gastroenteritis in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol.* 49(2):574-578.
- Cowden J.M., Ahmed S., Donaghy M., Riley A. 2001. Epidemiological investigation of the central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol Infect.* 126(3):335-341.
- Cravioto A., Vázquez V., Soria A., Navarro A., Ortiz M. 1988. Producción de citotoxina tipo shiga (SLT) 1 en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural / Production of shiga like toxin (SLT) 1 in strains of *Escherichia coli* isolated from infants with diarrhoea in a rural community. *Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx.* 45(4):206-209.
- Creuzburg K., Schmidt H. 2007. Molecular characterization and distribution of genes encoding members of the type III effector NleA family among pathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45:2498-2507.
- Creuzburg K., Köhler B., Hempel H., Schreier P., Jacobs E., Schmidt H. 2005. Genetic structure and chromosomal integration site of the cryptic prophage CP-1639 encoding Shiga toxin 1. *Microbiology.* 151(Pt 3):941-950.
- Crim S.M., Iwamoto M., Huang J.Y., Griffin P.M., Gilliss D., Cronquist A.B., Cartter M., Tobin-D'Angelo M., Blythe D., Smith K., Lathrop S., Zansky S., Cieslak P.R., Dunn J., Holt K.G., Lance S., Tauxe R., Henao O.L. 2014. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food -Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 2006-2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report,* 63(15):328-332.
- Crump J.A., Sulka A.C., Langer A.J., Schaben C., Crielly A.S., Gage R., Baysinger M., Moll M., Withers G., Toney D.M., Hunter S.B., Hoekstra R.M., Wong S.K., Griffin P.M., Van Gilder T.J. 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med.* 347(8):555-560.
- Dhabi G., Mora A., Mamani R., López C., Alonso M.P., Marzoa J., Blanco M., Herrera A., Viso S., García-Garrote F., Tchesnokova V., Billig M., de la Cruz F., de Toro M., González-López J.J., Prats G., Chaves F., Martínez-Martínez L., López-Cerezo L., Denamur E., Blanco J. 2014. Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-ST131: comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. *Int J Med Microbiol.* 304(8):1247-1257.
- Dallman T., Smith G.P., O'Brien B., Chattaway M.A., Finlay D., Grant K.A., Jenkins C. 2012. Characterization of a verocytotoxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O111:H21 strain associated with a household outbreak in Northern Ireland. *Journal of Clinical Microbiology,* 50(12):4116-4119.
- Dallman T., Cross L., Bishop C., Perry N., Olesen B., Grant K.A., Jenkins C. 2013. Whole genome sequencing of an unusual serotype of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 19(8):1302-1304.
- Dallman T.J., Byrne L., Ashton P.M., Cowley L.A., Perry N.T., Adak G., Petrovska L., Ellis R.J., Elson R., Underwood A., Green J., Hanage W.P., Jenkins C., Grant K., Wain J. 2015. Whole-

- genome sequencing for national surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Clin Infect Dis.* 61(3):305-312.
- Dambrosio A., Lorusso V., Quaglia N.C., Parisi A., La Salandra G., Virgilio S., Mula G., Lucifora G., Celano G.V., Normanno G. 2007. *Escherichia coli* O26 in minced beef: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern. *Int J Food Microbiol.* 118(2):218-222.
- Davis M. 1994. Update multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers -Western United-States, 1992-1993 (Vol 269, pg 2194, 1993). *JAMA-Journal of the American Medical Association*, 271(5):341-341.
- Davies, M., Engel, J., Griffin, D., Ginzl, D., Hopkins, R., Blackmore, C., et al. Center for Disease Control and Prevention. 2005. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 associated with petting zoos--North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 54(50):1277-1280.
- De Baets L., Van der Taelen I., De Filette M., Piérard D., Allison L., De Greve H., Hernalsteens J.P., Imberechts H. 2004. Genetic typing of shiga toxin 2 variants of *Escherichia coli* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol.* 70(10):6309-6314.
- De Boer E., Heuvelink A.E. 2001. Foods as vehicles of VTEC infection. En: Verocytotoxigenic *E. coli*. Eds. Duffy G., Garvey P., McDowell A. Food and Nutrition Press. USA: 181-200.
- De Schrijver K., Buvens G., Possé B., Van den Branden D., Oosterlynck O., De Zutter L., Eilers K., Piérard D., Dierick K., Van Damme-Lombaerts R., Lauwers C., Jacobs R. 2008. Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Euro Surveill.* 13(7).
- Dean P., Kenny B. 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol.* 12(1):101-109.
- Debroy C., Roberts E., Valadez A.M., Dudley E.G., Cutter C.N. 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145, and O157 serogroups by multiplex polymerase chain reaction of the *wzx* gene of the O-antigen gene cluster. *Foodborne Pathog Dis.* 8(5):651-652.
- Delannoy S., Beutin L., Fach P. 2012. Use of clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequence polymorphisms for specific detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of serotypes O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28, and O157:H7 by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12):4035-4040.
- Denny J., Bhat M., Eckmann K. 2008. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathog Dis.* 5(3):321-328.
- Desmarchelier P.M., Bilge S.S., Fegan N., Mills L., Vary Jr. J.C., 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.
- DesRosiers A., Fairbrother J.M., Johnson R.P., Desautels C., Letellier A., Quessy S. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* verotoxin-producing isolates from humans and pigs. *J Food Prot.* 64(12):1904-1911.
- Devaux I., Varela-Santos C., Payne-Hallström L., Takkinen J., Bogaardt C., Coulombier D. 2015. Investigation of travel-related cases in a multinational outbreak: example of the Shiga-toxin producing *E. coli* outbreak in Germany, May-June 2011. *Epidemiology and Infection*, 1-7.
- Diarra M.S., Giguère K., Malouin F., Lefebvre B., Bach S., Delaquis P., Aslam M., Ziebell K.A., Roy G. 2009. Genotype, serotype, and antibiotic resistance of sorbitol-negative *Escherichia coli* isolates from feedlot cattle. *J Food Prot.* 72(1):28-36.
- Dipinetto L., Santaniello A., Fontanella M., Lagos K., Fioretti A., Menna L.F. 2006. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Lett Appl Microbiol.* 43(3):293-295.
- Djordjevic S.P., Hornitzky M.A., Bailey G., Gill P., Vansleow B., Walker K., 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.
- Djordjevic S.P., Ramachandran V., Bettelheim K.A., Vansleow B., Holst P., Bailey G., Hornitzky M.A. 2004. Serotypes and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3910-3917.
- Djuretic T., Wall P.G., Nichols G. 1997. General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Commun Dis Rep CDR Rev.* 7(3):R41-45. Erratum in: *Commun Dis Rep CDR Rev* 1997 Apr 4;7(4):R54.
- Doane C.A., Pangloli P., Richards H.A., Mount J.R., Golden D.A., Draughon F.A. 2007. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse farm environments. *J Food Prot.* 70(1):6-10.
- Dobrindt U., Agerer F., Michaelis K., Janka A., Buchrieser C., Samuelson M., Svanborg C., Gottschalk C., Karch H., Hacker J. 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J. Bacteriol.* 185:1831-1840.
- Donnenberg M., Whittam T. 2001. "Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*". *J Clin Invest* 107:539-548.
- Donnenberg M.S., Kaper J.B. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 60(10):3953-3961.

- Dormanesh B., Siroosbakhat S., Karimi Goudarzi P., Afsharkhas L. 2015. Shiga Toxigenic *Escherichia coli* in Iranian Pediatric Patients With and Without Diarrhea: O-Serogroups, Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Properties. *Iran Red Crescent Med J.* 17(10):e29706.
- dos Santos L.F., Irino K., Vaz T.M., Guth B.E. 2010. Set of virulence genes and genetic relatedness of O113:H21 *Escherichia coli* strains isolated from the animal reservoir and human infections in Brazil. *J Med Microbiol.* 59(Pt 6):634-640.
- Doyle M.E., Archer J., Kaspar C.W., Weiss R. 2006. Human illness caused by *E. coli* O157:H7 from food and non-food sources. *FRI Briefings.* Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, EE.UU., pp. 37.
- Doyle M.P., Schoeni J.L. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2394-2396.
- Doyle M.P., Zhao T., Meng J., Zhao S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. En: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.* Eds. Doyle M.D., Beuchat L.R., Montville T.J. ASM Press. Washington.: 171-191.
- Drysdale M., MacRae M., Strachan N.J.C., Reid T.M.S., Ogden I.D. 2004. The detection of non-O157 *E. coli* in food by immunomagnetic separation. *J. Appl. Microbiol.* 97:220-224.
- Dunn J.R., Keen J.E., Moreland D., Alex T. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer from Louisiana. *J Wildl Dis.* 40(2):361-365.
- Durmaz R., Otlu B., Koksak F., Hosoglu S., Ozturk R., Ersoy Y., Aktas E., Gursoy N.C., Caliskan A. 2009. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis.* 62(5):372-377.
- Durso LM, Bono JL, Keen JE. 2005a. Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26:H11. *Appl Environ Microbiol.* 71(8):4941-4944.
- Dykhuizen D.E., Green L. 1991. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. *J Bacteriol* 173:7257-7268.
- Dziva F., Mahajan A., Cameron P., Currie C., McKendrick I.J., Wallis T.S., Smith D.G., Stevens M.P. 2007. EspP, a Type V-secreted serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* 271(2):258-264.
- ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. 2011. (http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvicelayouts/forms/Revi ew_DispForm.aspx?List=a3216f4c-f040-4f51-9f77-a96046dbfd72ID=602).
- ECDC and EFSA, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and European Food Safety Authority (EFSA). 2011. Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Stockholm: ECDC; 2011. (http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/166e.pdf).
- EFSA, European Food Safety Authority. 2007. Scientific opinion of the panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *EFSA Journal,* 579: 1-61.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2009. Scientific report of EFSA: Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). *EFSA Journal,* 7(11): 11366-1409.
- EFSA working group (2010) Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne outbreaks in the European Union in 2008. ed. European Food Safety Authority pp. 1496.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2011. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. *EFSA Journal* 9(10):2390 [22 pp.].
- EFSA, European Food Safety Authority. 2011a. Urgent advise on the public health risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *EFSA Journal,* 9(6): 2274-2324.
- EFSA Journal. 2013. Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. 11(4):3138.
- EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2012. The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal,* 10(3):2597-3039.
- EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. The European Union Summary on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal,* 12(2):3547-3859.
- EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. Multi-country outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with haemolytic uraemic syndrome. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1017e.pdf.
- Eggert M., Stüber E., Heurich M., Fredriksson-Ahomaa M., Burgos Y., Beutin L., Märtlbauer E. 2012. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces and lymphatic tissue of free-ranging deer. *Epidemiol Infect.* 28:1-9.

- Eichhorn I., Heidemanns K., Semmler T., Kinnemann B., Mellmann A., Harmsen D., Anjum M.F., Schmidt H., Fruth A., Valentin-Weigand P., Heesemann J., Suerbaum S., Karch H., Wieler L.H. 2015. Highly Virulent Non-O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Serotypes Reflect Similar Phylogenetic Lineages, Providing New Insights into the Evolution of EHEC. *Appl Environ Microbiol* 81(20):7041-7047.
- Eigner U., Holfelder M., Oberdorfer K., Betz-Wild U., Bertsch D., Fahr A.M. 2009. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin. Lab.* 55, 289-296.
- Ejidokun O.O., Walsh A., Barnett J., Hope Y., Ellis S., Sharp M.W., Paiba G.A., Logan M., Willshaw G.A., Cheasty T. 2006. Human Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) O157 infection linked to birds. *Epidemiol Infect.* 134(2):421-423.
- Eklund M., Scheutz F., Siitonen A. 2001. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J Clin Microbiol.* 39(8):2829-2834.
- Eklund M., Leino K., Siitonen A. 2002. Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. *J. Clin. Microbiol.* 40:4585-4593.
- Eklund M., Bielaszewska M., Nakari U.M., Karch H., Siitonen A. 2006. Molecular and phenotypic profiling of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- human isolates from Finland. *Clin Microbiol Infect.* 12(7):634-641.
- Elder R.O., Keen J.E., Siragusa G.R., Barkocy-Gallagher G.A., Koohmaraie M., Laegreid W.W. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *PNAS* 97:2999-3003.
- Eleizalde M., Parra N., Palomino C. 2012. La Biotecnología desde la pedagogía: El aprendizaje por descubrimiento como una alternativa efectiva. 1era ed. Caracas: Editorial Académica Española.
- Elliott E.J., Robins-Browne R.M., O'Loughlin E.V., Bennett-Wood V., Bourke J., Henning P., Hogg G.G., Knight J., Powell H., Redmond D.; Contributors to the Australian Paediatric Surveillance Unit. 2001. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child.* 85(2):125-131.
- Erickson J.P., Stamer J.W., Hayes M., Mckenna D.N., Van Alstine L.A. 1995. An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behaviour in low-pH dressings. *J. Food Prot.* 58:1059-1064.
- Erjavec M., Bertok D. 2015. Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans--the Trojan horse within our gut. *FEMS Microbiol Lett.* 362.
- Escherich T. 1885. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschritte der Medizin.* 3:515-522.
- Escobar-Páramo P., Grenet K., Le Menac'h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Rahimy M.C., Andremont A., Denamur E., Ruimy R. 2004a. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 70(9):5698-5700.
- Escobar-Páramo P., Sabbagh A., Darlu P., Pradillon O., Vaury C., Denamur E., Lecointre G. 2004b Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: the *Escherichia coli* case study. *Mol Phylogenet Evol* 30:243-250.
- Espié E., Vaillant V., Mariani-Kurkdjian P., Grimont F., Martin-Schaller R., De Valk H., Vernozzy-Rozand C. 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect.* 134(1):143-146.
- Etcheverría A.I., Padola N.L. 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence.* 4(5):366-372.
- Ethelberg S., Olsen K.E., Scheutz F., Jensen C., Schiellerup P., Enberg J., Petersen A.M., Olesen B., Gerner-Smidt P., Mølbak K. 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 10(5):842-847.
- Ethelberg S., Smith B., Torpdahl M., Lisby M., Boel J., Jensen T., Mølbak K. 2007. An outbreak of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007. *Euro Surveill.* 12(5):E070531.4.
- Ethelberg S., Smith B., Torpdahl M., Lisby M., Boel J., Jensen T., Nielsen E.M., Mølbak K. 2009. Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. *Clin Infect Dis.* 48(8):e78-81.
- Ewing W.H. 1986. The genus *Escherichia*. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4 ed. Capítulo 6. Elsevier, Nueva York.: 93-134.
- Ewing W.H., y P.R. Edwards. 1954. Isolation and preliminary identification of *Escherichia coli* serotypes associated with cases of diarrhea of the newborn. *Public Health Lab.* 12:75-81.
- Fagan P.K., Hornitzky M.A., Bettelheim K.A., Djordjevic S.P. 1999. Detection of Shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 868-872.
- Farroq S., Hussain I., Mir M.A., Bhat M.A., Wani S.A. 2009. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Letters in Applied Microbiology* 48:692-697.
- Fegan N., Vanderlinde P., Higgs G., Desmarchelier P. 2004. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces

of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol.* 97(2):362-370.

Feil E.J., Holmes E.C., Bessen D.E., Chan M.S., Day N.P.J., Enright M.C., Goldstein R., Hood D.W., Kalia A., Moore C.E., Zhou J., Spratt B.G. 2001. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: Short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 98:182.

Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M., Hanage W.P., Spratt B.G. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 186(5):1518-1530.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Feng L., Wang W., Tao J., Guo H., Krause G., Beutin L., Wang L. 2004. Identification of *Escherichia coli* O114 O-antigen gene cluster and development of an O114 serogroup-specific PCR assay. *J Clin Microbiol.* 42(8):3799-3804.

Feng L., Senchenkova S.N., Tao J., Shashkov A.S., Liu B., Shevelev S.D., Reeves P.R., Xu J., Knirel Y.A., Wang L. 2005. Structural and genetic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 O antigen and development of an O145 serogroup-specific PCR assay. *J Bacteriol.* 187(2):758-764.

Feng P., Lampel K.A., Karch H., Whittam T.S. 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis.* 177:1750-1753.

Feng P., Weagant S.D., Monday S.R. 2001. Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol.* 39(1):24-28.

Feng P.C., Monday S.R., Lacher D.W., Allison L., Siitonen A., Keys C., Eklund M., Nagano H., Karch H., Keen J., Whittam T.S. 2007. Genetic diversity among clonal lineages within *Escherichia coli* O157:H7 stepwise evolutionary model. *Emerg Infect Dis.* 13(11):1701-1706.

Feng P.C., Councell T., Keys C., Monday S.R. 2011a. Virulence characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates from wholesale produce. *Appl Environ Microbiol.* 77(1):343-345.

Feng P.C., Jinneman K., Scheutz F., Monday S.R. 2011b. Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Appl Environ Microbiol.* 77(18):6699-6702.

Feng P.C., Reddy S. 2013. Prevalences of Shiga toxin subtypes and selected other virulence factors among Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Appl Environ Microbiol.* 79(22):6917-6923.

Feng P.C., Delannoy S., Lacher D.W., Dos Santos L.F., Beutin L., Fach P., Rivas M., Hartland E.L., Paton A.W., Guth B.E. 2014.

Genetic diversity and virulence potential of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O113:H21 strains isolated from clinical, environmental, and food sources. *Appl Environ Microbiol.* 80(15):4757-4763.

Ferguson D.D., Scheffel J., Cronquist A., Smith K., Woo-Ming A., Anderson E., Knutsen J., De A.K., Gershman K. 2005. Temporally distinct *Escherichia coli* O157 outbreaks associated with alfalfa sprouts linked to a common seed source--Colorado and Minnesota, 2003. *Epidemiol Infect.* 133(3):439-447.

Fernández A. 2010. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) y enteropatógenicos (ECEP) en carne de vacuno. Facultad de Ciencias de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.

Fernández D., Irino K., Sanz M.E., Padola N.L., Parma A.E. 2010. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. *Lett Appl Microbiol.* 51(4):377-3782.

Fernández D., Krüger A., Polifroni R., Bustamante A.V., Sanso A.M., Etcheverría A.I., Lucchesi P.M., Parma A.E., Padola N.L. 2013. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:9.

Fey P.D., Wickert R.S., Rupp M.E., Safranek T.J., Hinrichs S.H. 2000. Prevalence of non-O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. *Emerg Infect Dis.* 6(5):530-3. Erratum in: *Emerg Infect Dis* 2001 May-Jun;7(3):491.

Fierz L., Cernela N., Hauser E., Nüesch-Inderbinen M., Stephan R. 2017. Characteristics of Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated during 2010-2014 from Human Infections in Switzerland. *Front Microbiol.* 8:1471.

Fischer J.R., Zhao T., Doyle M.P., Goldberg M.R., Brown C.A., Sewell C.T., Kavanaugh D.M., Bauman C.D. 2001. Experimental and field studies of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer. *Appl Environ Microbiol.* 67(3):1218-1224.

Fisher I.S., Threlfall E.J. 2005. The Enter-net and Salm-gene databases of foodborne bacterial pathogens that cause human infections in Europe and beyond: an international collaboration in surveillance and the development of intervention strategies. *Epidemiol Infect.* 133(1):1-7.

Fleckenstein J.M., Kopecko D.J., Warren R.L., Elsinghorst E.A. 1996. Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 64:2256-2265.

Foley S., Grant K. 2007. Molecular techniques of detection and discrimination of foodborne pathogens and their toxins. *En: Simjee S. Foodborne diseases.* Totowa, NJ: Humana Press. p. 485-510. 11. Ward P, Roy D. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait.* 2005; 85:23-32.

- Foley S.L., Simjee S., Meng J., White D.G., McDermott P.F., Zhao S. 2004. Evaluation of molecular typing methods for *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle, food, and humans. *J Food Prot.* 67:651-657.
- Francisco A.P., Bugalho M., Ramirez M., Carriço J.A. 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics.* 18:10:152.
- Franck S.M., Bosworth B.T., Moon H.W. 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J. Clin. Microbiol.* 36:1795-1797.
- Frank C., Werber D., Cramer J.P., Askar M., Faber M., an der Heiden M., Bernard H., Fruth A., Prager R., Spode A., Wadl M., Zoufaly A., Jordan S., Kemper M.J., Follin P., Müller L., King L.A., Rosner B., Buchholz U., Stark K., Krause G; HUS Investigation Team. 2011. Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *N Engl J Med.* 365(19):1771-1780.
- Franklin A.B., Vercauteren K.C., Maguire H., Cichon M.K., Fischer J.W., Lavelle M.J., Powell A., Root J.J., Scallan E. 2013. Wild ungulates as disseminators of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in urban areas. *PLoS One.* 8(12):e81512.
- Fratamico P.M., Sackitey S.K., Wiedmann M., Deng M.Y. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2188-2191.
- Fremaux B., Prigent-Combaret C., Delignette-Muller M.L., Mallen B., Dothal M., Gleizal A., Vernozy-Rozand C. 2008. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types. *J Appl Microbiol.* 104(1):296-304.
- Frenzen P.D., Drake A., Angulo F.J., Emerging Infections Program FoodNet Working Group. 2005. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. *J Food Prot.* 68(12):2623-2630.
- Friedman M.S., Roels T., Koehler J.E., Feldman L., Bibb W.F., Blake P. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool. *Clin. Infect. Dis.* 29(2):298-303.
- Friedrich A.W., Bielaszewska M., Zhang W.L., Pulz M., Kuczius T., Ammon A., Karch H. 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* 185(1):74-84.
- Friedrich A.W., Borell J., Bielaszewska M., Fruth A., Tschäpe H., Karch H. 2003. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *J Clin Microbiol.* 41(6):2448-2453.
- Fruth A., Prager R., Friedrich A., Kuczius T., Roggentin P., Karch H., Ammon A., Bockemühl J., Tschäpe H. 2002. Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland von 1998 bis 2001. *Bundesgesundhbl.* 45:715-721.
- Fruth A., Prager R., Tietze E., Rabsch W., Flieger A. 2015. Molecular epidemiological view on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing human disease in Germany: Diversity, prevalence, and outbreaks. *Int J Med Microbiol.* 305(7):697-704.
- Fukushima H., Seki R. 2004. High numbers of shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 238:189-197.
- Fukushima H., Hashizume T., Morita Y., Tanaka J., Azuma K., Mizumoto Y., Kaneno M., Matsu-ura M.O., Konma K., Kitani T. 1999. Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatrics International.* 41(2):213-217.
- Fukuyama M., Yokoyama R., Sakata S., Furuhashi K., Oonaka K., Hara M., Satoh Y., Tabuchi K., Itoh T., Kai A., Matsuda M. 1999. Study on the verotoxin-producing *Escherichia coli*-isolation of the bacteria from deer dung. *Kansenshogaku Zasshi.* 73(11):1140-1144.
- Funk J., Stoeber H., Hauser E., Schmidt H. 2013. Molecular analysis of subtilase cytotoxin genes of food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli* reveals a new allelic *subAB* variant. *BMC Microbiol.* 13:230.
- Galiero G., Conedera G., Alfano D., Caprioli A. 2005. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Vet Rec.* 156(12):382-383.
- Gannon V.P., Rashed M., King R.K., Golsteyn Thomas E.J. 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.
- Gannon V.P., D'Souza S., Graham T., King R.K., Rahn K., Read S. 1997a. 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.
- Gannon V.P., D'Souza S., Graham T., King R.K. 1997b. Specific identification of *E. coli* O157:H7 using a multiplex PCR assay. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412:81-82.
- Garabal J.I., Gonzalez E.A., Vazquez F., Blanco J., Blanco M. 1995. Toxigenic *Escherichia coli* in Spanish piggeries from 1986 to 1991. *Vet Microbiol.* 47(1-2):17-25.
- García I. 2009. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* diarregénicos en carne de vacuno. Facultad de Ciencias de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- García-Aljaro C., Muniesa M., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Jofre J., Blanch A.R. 2005. Characterization of Shiga toxin-

- producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol Lett.* 246(1):55-65.
- García-Sánchez A., Sánchez S., Rubio R., Pereira G., Alonso J.M., Hermoso de Mendoza J., Rey J. 2007. Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. *Vet Microbiol.* 121(3-4):373-377.
- Garrido P., Blanco M., Moreno-Paz M., Briones C., Dahbi G., Blanco J., Parro V. 2006. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: A new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clinical Chemistry*, 52(2):192-201.
- Gasser C., Gautier E., Steck A., Siebenmann R.E., Oechslin R. 1955. Hämolytisch urämische Syndrome: bilaterale Nierenrindennekrosen bei akute erworbenen hämolitischen Anämien. *Schweizer Med Wochenschr* 85:905-909.
- Gault G., Weill F.X., Mariani-Kurkdjian P., Jourdan-da Silva N., King L., Aldabe B., Charron M., Ong N., Castor C., Mace M., Bingen E., Noel H., Vaillant V., Bone A., Vendrely B., Delmas Y., Combe C., Bercion R., d'Andigne E., Desjardin M., de Valk H., Rolland P. 2011. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011. *Euro Surveill.* 16(26). pii: 19905.
- Geldreich E.E., Fox K., Goodrich J.A., Rice E.W., Clark R.M., Swerdlow D.L. 1992. Searching for a water supply connection in the Cabool, Missouri disease outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Water Research* 26:1127-1137.
- Gencay Y.E. 2014. Sheep as an important source of *E. coli* O157/O157:H7 in Turkey. *Vet Microbiol.* 172(3-4):590-595.
- Gerber A., Karch H., Allerberger F., Verweyen H.M., Zimmerhackl L.B. 2002. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: A prospective study. *J. Infect. Dis.* 186:493-500.
- Gerhardt E., Masso M., Paton A.W., Paton J.C., Zotta E., Ibarra C. 2013. Inhibition of water absorption and selective damage to human colonic mucosa are induced by subtilase cytotoxin produced by *Escherichia coli* O113:H21. *Infect Immun.* 81(8):2931-2937.
- Gerner-Smidt P., Scheutz F. 2006. Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis.* 3(1):74-80.
- Gerner-Smidt P., K. Hise, J. Kincaid, S. Hunter, S. Rolando, E. Hyttia-Trees, E. M. Ribot, B. Swaminathan, and the PulseNet Taskforce. 2006. PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog. Dis.* 39-19.
- Geue L., Selhorst T., Schnick C., Mintel B., Conraths F.J. 2006. Analysis of the clonal relationship of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O165:H25 isolated from cattle. *Appl Environ Microbiol.* 72(3):2254-2259.
- Geue L., Klare S., Schnick C., Mintel B., Meyer K., Conraths F. J. 2009. Analysis of the clonal relationship of serotype O26:H11 enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates from cattle. *Appl Environ. Microbiol.* 75(21):6947-6953.
- Geue L., Schares S., Mintel B., Conraths F.J., Müller E., Ehricht R. 2010. Rapid microarray-based genotyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O156:H25/H-/Hnt isolates from cattle and clonal relationship analysis. *Appl Environ Microbiol.* 76(16):5510-5519.
- Geue L., Menge C., Eichhorn I., Semmler T., Wieler L.H., Pickard D., Berens C., Barth S.A. 2017. Evidence for Contemporary Switching of the O-Antigen Gene Cluster between Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Colonizing Cattle. *Front Microbiol.* 8:424.
- Gilmour M.W., Cote T., Munro J., Chui L., Wylie J., Isaacs-Renton J., Horsman G., Tracz D.M., Andrysiak A., Ng L.K. 2005. Multilocus sequence typing of *Escherichia coli* O26:H11 isolates carrying stx in Canada does not identify genetic diversity. *J Clin Microbiol.* 43(10):5319-5323.
- Girardeau J.P., Dalmaso A., Bertin Y., Ducrot C., Bord S., Livrelli V., Vernozzy-Rozand C., Martin C. 2005. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol.* 43(12):6098-6107.
- Girón J.A., Ho A.S.Y., Schoolnik G.K. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 254(5032): 710-713.
- Goering R.V. 1993. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 14(10):595-600. Review.
- Goering R.V. 2000. The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. *Reviews in Medical Microbiology.* 11(3):145-152.
- Goffaux F., China B., Janssen L., Mainil J. 2000. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Res. Microbiol.* 151:865-871.
- Goh S., Newman C., Knowles M., Bolton F.J., Hollyoak V., Richards S., Daley P., Counter D., Smith H.R., Keppie N. 2002. *E. coli* O157 phage type 21/28 outbreak in North Cumbria associated with pasteurized milk. *Epidemiol Infect.* 129(3):451-457.
- Goldwater P.N., Bettelheim K.A. 1995. Hemolytic uremic syndrome due to shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O48:H21 in South Australia. *Emerg Infect Dis.* 1(4):132-133.

- Goldwater P.N., Bettelheim K.A. 1996. An outbreak of hemolytic uremic syndrome due to *Escherichia coli* O157:H7: or was it? *Emerg Infect Dis.* 2(2):153-154.
- Goldwater P.N., Bettelheim K.A. 1998. New perspectives on the role of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes in human disease. *J. Med. Microbiol.* 47:1039-1045.
- Gomariz M., Robetson M.T., Serrano E., Iglesias L., Pérez-Trallero E. 2000. Estudio de dos brotes de *E. coli* O157:H7 en Guipúzcoa. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 18: S1: 84.
- Gomes T.A.T., Irino K., Girão D.M., Girão V.B., Guth B.E., Vaz T.M., Moreira F.C., Chinarelli S.H., Vieira M.A. 2004. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Emerging Infectious Diseases.* 10(10):1851-1855.
- Gómez V. 2017. Caracterización de cepas de origen aviar de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido y del grupo clonal de alto riesgo ST131. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Gonzalez A.G., Cerqueira A.M., Guth B.E., Coutinho C.A., Liberal M.H., Souza R.M., Andrade J.R. 2016. Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. *J Appl Microbiol.* 121(4):1130-1143.
- González E.A., Blanco J. 1985. Production of cytotoxin VT in enteropathogenic and non enteropathogenic *Escherichia coli* strains of porcine origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 26:127-130.
- Goosney D.L., DeVinney R., Pfuetzner R.A., Frey E.A., Strynadka N.C., Finlay B.B. 2000. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Curr. Biol.* 10(12):735-738.
- Gordon D.M., Cowling A. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology.* 149:3575-3586.
- Gordon D.M., Clermont O., Tolley H. y Denamur E. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 10, 2484-2496.
- Gould L.H. 2009. Update on the epidemiology of Shiga toxin-producing *E. coli* in the United States. Paper presented at the Annual Capital Area Food Protection Association Meeting, Centers for Disease Control and Prevention, Washington, DC.
- Gould L.H., Mody R.K., Ong K.L., Clogher P., Cronquist A.B., Garman K.N., Lathrop S., Medus C., Spina N.L., Webb T.H., White P.L., Wymore K., Gierke R.E., Mahon B.E., Griffin P.M. 2013. Emerging Infections Program Foodnet Working Group. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis.* 10(5):453-460.
- Grant J., Wendelboe A.M., Wendel A., Jepson B., Torres P., Smelser C., Rolfs R.T. 2008. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerg Infect Dis.* 14(10):1633-1636
- Griffin P.M., Tauxe R.V. 1991. 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.
- Griffin P.M., Ostraff S.M., Tauxe R.V., Greene K.D., Wells J.G., Lewis J.H., Blake A. 1988. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Ann. Intern. Med.* 109:705-712.
- Grys T.E., Siege M.B., Lathem W.W., Welch R.A. 2005. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infection and Immunity,* 73(3):1295-1303.
- Grys T.E., Walters L.L., Welch R.A. 2006. Characterization of the StcE protease activity of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 188(13):4646-4653.
- Guinée P.A.M., Agterberg C.M., Jansen W.H. 1972. *Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique. *Appl Microbiol* 24:127-131.
- Guinée P.A.M., Jansen H.W., Wandström T., Sellwood R. 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhea in piglets and calves. En: Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhea: Current Topics in veterinary and animal Science. Eds. Leeww P.W., Guinée P.A.M. Martinus Nijhoff Publishers. Holanda. 13:126-162.
- Guth B.E., Vaz T.M., Gomes T.A., Chinarelli S.H., Rocha M.M., de Castro A.F., Irino K. 2005. Re-emergence of O103: H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. *J Med Microbiol.* 54(Pt 8):805-806.
- Gyles C.L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci.* 85(13 Suppl):E45-62.
- Hall BG, Barlow M. 2006. Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. *Ann Epidemiol.* 16(3):157-169.
- Hammermueller J., Kruth S., Prescott J., Gyles C. 1995. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can J Vet Res.* 59(4):265-270.
- Hancock D., Besser T., Lejeune J., Davis M., Rice D. 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol.* 66:71-78.
- Harsono K.D., Kaspar C.W., Luchansky J.B. 1993. Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 59(9):3141-3144.

- Hartl D.L., Dykhuizen D.E. 1984. The population genetics of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 18:31-68. Review.
- Hashimoto H., Mizukoshi K., Nishi M., Kawakita T., Hasui S., Kato Y., Ueno Y., Takeya R., Okuda N., Takeda T. 1999. Epidemic of gastrointestinal tract infection including hemorrhagic colitis attributable to Shiga toxin 1-producing *Escherichia coli* O118:H2 at a junior high school in Japan. *Pediatrics*, 103(1).
- Haus-Cheymol R., Espie E., Che D., Vaillant V., De Valk H., Desenclos J.C. 2006. Association between indicators of cattle density and incidence of paediatric haemolytic-uraemic syndrome (HUS) in children under 15 years of age in France between 1996 and 2001: an ecological study. *Epidemiology and Infection*, 134(4):712-718.
- Hedican E.B., Medus C., Besser J.M., Juni B.A., Koziol B., Taylor C., Smith K.E. 2009. Characteristics of O157 versus non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Minnesota, 2000-2006. *Clin Infect Dis.* 49(3):358-364.
- Heiman K.E., Mody R.K., Johnson S.D., Griffin P.M., Gould L.H. 2015. *Escherichia coli* O157 Outbreaks in the United States, 2003-2012. *Emerg Infect Dis.* 21(8):1293-1301.
- Heinikainen S., Pohjanvirta T., Eklund M., Siitonen A., Pelkonen S. 2007. Tracing shigatoxigenic *Escherichia coli* O103, O145, and O174 infections from farm residents to cattle. *J Clin Microbiol.* 45(11):3817-3820.
- Heir E., Lindstedt B.A., Vardund T., Wasteson Y., Kapperud G. 2000. Genomic fingerprinting of shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains: comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and fluorescent amplified-fragment-length polymorphism (FAFLP). *Epidemiol Infect.* 125(3):537-548.
- Henderson I.R., Nataro J.P. 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 69: 1231-1243.
- Hernández R.T., Elias W.P., Vieira M.A., Gomes T.A. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 297(2):137-149.
- Herrera A. 2005. Prevalencia y caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* diarreagénicos aislados de alimentos. Proyecto Fin de Carrera; Titulación de Ingeniería Técnica Agrícola en Industrias Agrarias y Alimentarias. Universidad de Santiago de Compostela.
- Herrera A. 2008. Prevalencia y caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) y enteropatogénicos (ECEP) en carne de vacuno. Proyecto fin de carrera; Titulación Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela.
- Herrera A. 2010. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* en carne de vacuno en Lugo (2005-2009). Trabajo de investigación para obtención de Diploma de Estudios Avanzados (DEA) por el Programa de Doctorado de Microbiología e Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela.
- Herrera A. 2015. El papel de los alimentos en la transmisión de *Escherichia coli* potencialmente patógenas para el hombre: prevalencia y caracterización de cepas diarreagénicas y productoras de β -lactamasas de espectro extendido. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Heuvelink, A.E., Van de Kar, N.C., Meis, J.F., Monnens, L.A., Melchers, W.J. 1995. Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolates from patients with haemolytic uraemic syndrome in Western Europe. *Epidemiology and Infection* 115, 1-14.
- Heuvelink A.E., Van Den Biggelaar F.L.A.M., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., Herbes R.G., Huyben R., Nagelkerke N., Melchers W.J.G., Monnens L.A.H., De Boer E. 1998. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12): 3480-3487.
- Heuvelink A.E., Zwartkruis-Nahuis J.T., van den Biggelaar F.L., van Leeuwen W.J., de Boer E. 1999a. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int J Food Microbiol.* 52(1-2):67-75.
- Heuvelink A.E., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., Beumer R.R., de Boer E. 1999b. Occurrence and survival of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J. Food Prot.* 62:1115-1122.
- Heuvelink A.E., van Heerwaarden C., Zwartkruis-Nahuis J.T., van Oosterom R., Edink K., van Duynhoven Y.T., de Boer E. 2002. *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol Infect.* 129(2):295-302.
- Hilborn E.D., Mermin J.H., Mshar P.A., Hadler J.L., Voetsch A., Wojtkunski C., Swartz M., Mshar R., Lambert-Fair M.A., Farrar J.A., Glynn M.K., Slutsker L. 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Intern Med.* 9-23;159(15):1758-1764.
- Hilborn E.D., Mshar P.A., Fiorentino T.R., Dembek Z.F., Barrett T.J., Howard R.T., Cartter M.L. 2000. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol Infect.* 124(1):31-36.
- Hildebrand J.M., Maguire H.C., Holliman, R.E., Kangesu E. 1996. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Communicable Disease Report Review* 6: R33-R36.
- Hiramatsu R., Matsumoto M., Miwa Y., Suzuki Y., Saito M., Miyazaki Y. 2002. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *J Clin Microbiol.* 40(3):922-925.
- Hiroi M, Takahashi N, Harada T, Kawamori F, Iida N, Kanda T, Sugiyama K, Ohashi N, Hara-Kudo Y, Masuda T. 2012. Serotype,

- Shiga toxin (Stx) type, and antimicrobial resistance of Stx-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Shizuoka Prefecture, Japan (2003-2007). *Jpn J Infect Dis.* 65(3):198-202.
- Hogan MC, Gloor JM, Uhl JR, Cockerill FR, Milliner DS. 2001. Two cases of non-O157:H7 *Escherichia coli* hemolytic uremic syndrome caused by urinary tract infection. *Am J Kidney Dis.* 38:1-6.
- Hogg R.A., Holmes J.P., Ghebrehewet S., Elders K., Hart J., Whiteside C., Willshaw G.A., Cheasty T., Kay A., Lynch K., Pritchard G.C. 2009. Probable zoonotic transmission of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O 157 by dogs. *Vet Rec.* 164(10):304-305.
- Holland R.D., Wilkes J.G., Rafii F., Sutherland J.B., Persons C.C., Voorhees K.J., Lay J.O., Jr 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10:1227-1232.
- Honish L., Predy G., Hislop N., Chui L., Kowalewska-Grochowska K., Trottier L., Kreplin C., Zazulak I. 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Can J Public Health.* 96(3):182-184.
- Horcajo P., Domínguez-Bernal G., De La Fuente R., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Orden J.A. 2010. Association of vt1c with verotoxin-producing *Escherichia coli* from goats and sheep. *J Vet Diagn Invest.* 22(2):332-334.
- Horcajo P., Domínguez-Bernal G., de la Fuente R., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Blanco J.E., Blanco M., Mora A., Dahbi G., López C., Puentes B., Alonso M.P., Blanco J., Orden J.A. 2012. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. *Veterinary Microbiology,* 155(2-4):341-348.
- Hornitzky M.A., Vanselow B.A., Walker K., Bettelheim K.A., Corney B., Gill P., Bailey G., Djordjevic S.P. 2002. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6439-6445.
- Hornitzky M.A., Mercieca K., Bettelheim K.A., Djordjevic S.P. 2005. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3405-3412.
- Hoshina K., Itagaki A., Seki R., Yamamoto K., Masuda S., Muku T., Okada N. 2001. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak caused by contaminated natural water supplied by facility owned by local community. *Jpn J Infect Dis.* 54(6):247-248.
- Hrudey S.E., Payment P., Huck P.M., Gillham R.W., Hrudey E.J. 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Science and Technology,* 47(3):7-14.
- Hu J., Torres A.G. 2015. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 729-734. 10.1016/j.cmi.2015.01.015.
- Hu J.K., Seo J., Choe Y.J. 2013. Outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169 enteritis in schoolchildren associated with consumption of kimchi, Republic of Korea, 2012. *Epidemiological Infection,* 142:616-623.
- Hu Y., Zhang Q., Meitzler J.C. 1999. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 87:867-876.
- Hussein HS. 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of animal science.* 85(13 Suppl):E63-72.
- Hussein H.S., Sakuma T. 2005. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J. Dairy Sci.* 88, 450-465.
- Hyytiä-Trees E., Smole S.C., Fields P.A., Swaminathan B., Ribot E.M. 2006. Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathog Dis.* 3(1):118-131.
- Iguchi A. 2016. A complete view of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster and the development of molecular-based O-serogrouping methods. *Nihon Saikingaku Zasshi.* 71(4):209-215.
- Iguchi A., Iyoda S., Ohnishi M, on behalf of the EHEC Study Group. 2012. Molecular Characterization Reveals Three Distinct Clonal Groups among Clinical Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Serogroup O103. *J Clin Microbiol.* 50(9):2894-2900.
- Iguchi A., Iyoda S., Kikuchi T., Ogura Y., Katsura K., Ohnishi M., Hayashi T., Thomson N.R. 2015a. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res.* 22(1):101-107.
- Iguchi A., Iyoda S., Seto K., Morita-Ishihara T., Scheutz F., Ohnishi M. 2015b. Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. *J Clin Microbiol.* 53(8):2427-2432.
- Iguchi A., Iyoda S., Seto K., Nishii H., Ohnishi M., Mekata H., Ogura Y., Hayashi T. 2016. Six Novel O Genotypes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 7:765.
- Instituto de Salud Carlos III, Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Economía y Competitividad, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 2013a. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2010. Centro Nacional De Epidemiología.

- Instituto de Salud Carlos III, Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Economía y Competitividad, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 2013b. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2011. Centro Nacional De Epidemiología.
- Instituto de Salud Carlos III, Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Economía y Competitividad, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 2015. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2012. Centro Nacional De Epidemiología.
- Irino K., Kato M.A., Vaz T.M., Ramos I.I., Souza M.A., Cruz A.S., Gomes T.A., Vieira M.A., Guth B.E. 2005. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Vet Microbiol.* 105(1):29-36.
- Irino K., Vaz T.M., Medeiros M.I., Kato M.A., Gomes T.A., Vieira M.A., Guth B.E. 2007. Serotype diversity as a drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. *J Med Microbiol.* 56(Pt 4):565-567.
- Irshad H., Cookson A.L., Prattley D.J., Dufour M., French N.P. 2014. Distribution of *Escherichia coli* strains harbouring Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)-associated virulence factors (stx1, stx2, eae, ehxA) from very young calves in the North Island of New Zealand. *Epidemiol Infect.* 6:1-11.
- Ishii S., Meyer K. P., y Sadowsky M.J. 2007. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18): 5703-5710.
- Islam M.A., Heuvelink A.E., de Boer E., Sturm P.D., Beumer R.R., Zwietering M.H., Faruque A.S., Haque R., Sack D.A., Talukder K.A. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhoea in Bangladesh. *J Med Microbiol.* 56(Pt 3):380-385.
- Ito H., Terai A., Kurazono H., Takeda Y., Nishibuchi M. 1990. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog.* 8(1):47-60. Erratum in: *Microb Pathog.* 8(6):449.
- Iyoda S., Wada A., Weller J., Flood S.J.A., Schreiber E., Tucker B., Watanabe H. 1999. Evaluation of AFLP, a high-resolution DNA finger-printing method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Microbiol. Immunol.* 43:803-806.
- Izumiya H., Terajima J., Wada A., Inagaki Y., Itoh K., Tamura K., Watanabe H. 1997. Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 35:1675-1680.
- Jackson M.P., Neill R.J., O'Brien A.D., Holmes R.K., Newland J.W. 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-toxin I and Shiga-toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:109-114.
- Jaros P., Cookson A.L., Campbell D.M., Besser T.E., Shringi S., Mackereth G.F., Lim E., Lopez L., Dufour M., Marshall J.C., Baker M.G., Hathaway S., Prattley D.J., French N.P. 2013. A prospective case-control and molecular epidemiological study of human cases of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in New Zealand. *BMC Infect Dis.* 13(1):450.
- Jauregui F., Landraud L., Passet V., Diancourt L., Frapy E., Guigon G., Carbonnelle E., Lortholary O., Clermont O., Denamur E., Picard B., Nassif X., Brisse S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9, 560.
- Jelacic J.K., Damrow T., Chen G.S., Jelacic S., Bielaszewska M., Ciol M., Carvalho H.M., Melton-Celsa A.R., O'Brien A.D., Tarr P.I. 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis.* 188(5):719-729.
- Jenkins C., Evans J., Chart H., Willshaw G.A., Frankel G. 2008. *Escherichia coli* serogroup O26—a new look at an old adversary. *J. Appl. Microbiol.* 104:14-25.
- Jenkins C., Dallman T.J., Launders N., Willis C., Byrne L., Jorgensen F., Eppinger M., Adak G.K., Aird H., Elviss N., Grant K.A., Morgan D., McLauchlin J. 2015. Public Health Investigation of Two Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 Associated with Consumption of Watercress. *Appl Environ Microbiol.* 81(12):3946-3952.
- Jeon B.W., Jeong J.M., Won G.Y., Park H., Eo S.K., Kang H.Y., Hur J., Lee J.H. 2006. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O26 and O111 from cattle in Korea. *Int J Food Microbiol.* 110(2):123-126.
- Jerse A.E., Kaper J.B. 1991. The eae gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun.* 59(12):4302-4309.
- Jerse A.E., Yu J., Tall B.D., Kaper J.B. 1990. A genetic-locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue-culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(20):7839-7843.
- Johnsen G., Wasteson Y., Heir E., Berget O.I., Herikstad H. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *International Journal of Food Microbiology*, 65(3):193-200.
- Johnson J.R., Stell A.L. 2001. PCR for specific detection of H7 flagellar variant of fliC among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 39:3712-3717.
- Johnson J.R., Stapleton A.E., Russo T.A., Scheutz F., Brown J.J., Maslow J.N. 1997. Characteristics and prevalence within

- serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of papG. *Infect Immun.* 65(6):2153-2159.
- Johnson J.R., Porter S., Johnston B., Kuskowski M.A., Spurbeck R.R., Mobley H.L., Williamson D.A. 2015. Host Characteristics and Bacterial Traits Predict Experimental Virulence for *Escherichia coli* Bloodstream Isolates From Patients With Urosepsis. *Open Forum Infect Dis.* 2: ofv083.
- Johnson K.E., Thorpe C.M., Sears C.L. 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis.* 43(12):1587-1595.
- Johnson R.P., Clarke R.C., Wilson J.B., Read S.C., Rahn K., Renwick S.A., Sandhu K.A., Alves D., Karmali M.A., Lior H., McEwen S.A., Spika J.S., Gyles C.L. 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection,* 59(10):1112-1122.
- Jones I.G. Roworth M. 1996. An outbreak of *Escherichia coli* O157 and Campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health,* 110(5):277-282.
- Jordan D.M., Cornick N., Torres A.G., Dean-Nystrom E.A., Kaper J.B., Moon H.W. 2004. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infect. Immun.* 72:6168-6171.
- Jores J., Zehmke K., Eichberg J., Rumer L., Wieler L.H. 2003. Description of a novel intimin variant (type zeta) in the bovine O84:NM verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. *Exp Biol Med* (Maywood). 228(4):370-376.
- Jores J., Wagner S., Rumer L., Eichberg J., Laturnus C., Kirsch P., Schierack P., Tschäpe H., Wieler L.H. 2005. Description of a 111-kb pathogenicity island (PAI) encoding various virulence features in the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain RW1374 (O103:H2) and detection of a similar PAI in other EHEC strains of serotype O103:H2. *Int J Med Microbiol.* 294(7):417-425.
- Ju W., Cao G., Rump L., Strain E., Luo Y., Timme R., Allard M., Zhao S., Brown E., Meng J. 2012. Phylogenetic analysis of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains by whole-genome sequencing. *J Clin Microbiol* 50:4123-4127.
- Ju W., Rump L., Toro M., Shen J., Cao G., Zhao S., Meng J. 2014. Pathogenicity islands in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, and O111 isolates from humans and animals. *Foodborne Pathog Dis* 11:342-345.
- Justel P. 2005. Serotipos, genes de virulencia y tipado molecular (PFGE) de *Escherichia coli* verotoxigénicos aislados de carne de vacuno en Lugo (2003-2005). Memoria DEA. Departamento de Microbiología e Parasitología, Universidade de Santiago de Compostela.
- Kaftyreva L.A., Makarova M.A., Konovalova T.A., Matveeva Z.N. 2013. Characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 isolated from a patient with hemolytic-uremic syndrome. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* (5):100-104.
- Kalchayanand N., Arthur T.M., Bosilevac J.M., Brichta-Harhay D.M., Guerini M.N., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M. 2007. Microbiological characterization of lamb carcasses at commercial processing plants in the United States. *J Food Prot.* 70(8):1811-1819.
- Kameyama M., Yabata J., Nomura Y., Tominaga K. 2015. Biochemical Features and Virulence Gene Profiles of Non-O157/O26 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains from Humans in the Yamaguchi Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 68(3):216-220.
- Kane W.H., Davie E.W. 1986. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6800-6804.
- Kaper J.B. 1996. Defining EPEC. *Revista De Microbiologia,* 27:130-133.
- Kaper J.B., O'Brien A.D. (Eds.) 1998. *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, USA.
- Kaper J.B., Elliot S.J., Sperandio V., Perna N.T., Mayhew G.F., Blattner F.R. 1998. Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Eds. Kaper J.B. O'Brien A.D. ASM Press, Washington, D.C.: 163-182.
- Kaper J.B., Mellies J.L., Nataro J.P. 1999. Pathogenicity islands and other mobile genetic elements of diarrheagenic *Escherichia coli*. En: *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements.* Eds. Kaper JB & Hacker J. ASM, Washington, D.C.: 33-53.
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology,* 2(2):123-140.
- Käppli U., Hächler H., Giezendanner N., Beutin L., Stephan R. 2011. Human Infections with Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000-2009. *Emerg Infect Dis.* 17(2):180-185.
- Karama M., Johnson R.P., Holtslander R., Gyles C.L. 2008. Phenotypic and genotypic characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 isolates from cattle and humans. *J Clin Microbiol.* 46(11):3569-3575.
- Karama M., Johnson R.P., Holtslander R., Gyles C.L. 2009. Production of verotoxin and distribution of O islands 122 and 43/48 among verotoxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 isolates from cattle and humans. *Appl Environ Microbiol.* 75(1):268-270.

- Karch H., Bielaszewska M. 2001. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol.* 39: 2043–2049.
- Karch H., Huppertz H., Bockemühl J., Schmidt H., Schwarzkopf A., Lissner R. 1997. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany. *J. Food Prot.* 60:1454-1457.
- Karch H., Schmidt H., Brunder W. 1998. Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157:H7. En: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Eds. Kaper J.B. O'Brien A.D. ASM, Washington D.C.: 183-194.
- Karch H., Bielaszewska M., Bitzan M., Schmidt H. 1999a. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 34(3):229-243. Review.
- Karch H., Schubert S., Zhang D., Zhang W., Schmidt H., Ölschläger T., Hacker J. 1999b. A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 67:5994-6001.
- Karch H., Tarr P.I., Bielaszewska M. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol.* 295(6-7):405-418. Review.
- Karch H., Friedrich A.W., Gerber A., Zimmerhackl L.B., Schmidt M.A., Bielaszewska M. 2006. New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32(2):105-112.
- Karch H., Denamur E., Dobrindt U., Finlay B.B., Hengge R., Johannes L., Ron E.Z., Tønjum T., Sansonetti P.J., Vicente M. 2012. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol Med.* 4(9):841-848.
- Karmali M.A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2(1):15-38. Review.
- Karmali M.A. 2004. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol. Biotechnol.* 26:117-122.
- Karmali M.A., Petric M., Lim C., Fleming P.C., Arbus G.S., Lior H. 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 151(5):775-782.
- Karmali M.A., Mascarenhas M., Shen S., Ziebell K., Johnson S., Reid-Smith R., Isaac-Renton J., Clark C., Rahn K., Kaper J.B. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol.* 41(11):4930-4940.
- Karmali M.A., Gannon V., Sargeant J.M. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 140(3-4):360-370.
- Kaspar C., Doyle M.E., Archer J. 2009. FRI Food Safety Review: non-O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. Food Research Institute, UW-Madison. (http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_NonO157STEC_4_10.pdf).
- Kaspar C., Doyle M.E., Archer J. 2010. White paper on non-O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. Fri Food Safety Reviews. Food Research Institute, UW-Madison: 1-26. Disponible en: http://fri.wisc.edu/files/Briefs_File/FRI_Brief_NonO157STEC_4_10.pdf.
- Kataoka Y., Irie Y., Sawada T., Nakazawa M. 2010. A 3-year epidemiological surveillance of *Escherichia coli* O157:H7 in dogs and cats in Japan. *J Vet Med Sci.* 72(6):791-794.
- Kato K., Shimoura R., Nashimura K., Yoshifuzi K., Shiroshita K., Sakurai N., Kodama H., Kuramoto S. 2005. Outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 among high school participants in excursion to Korea. *Jpn J Infect Dis.* 58(5):332-333.
- Kauffmann F. 1947. The serology of the coli group. *J Immunol.* 57(1):71-100.
- Kawamori F., Hiroi M., Harada T., Ohata K., Sugiyama K., Masuda T., Ohashi N. 2008. Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157 : H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE. *J Med Microbiol.* 57(Pt 1):58-63.
- Kawano K., Okada M., Haga T., Maeda K., Goto Y. 2008. Relationship between pathogenicity for humans and stx genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27(3):227-232.
- Keene W.E., Hedberg K., Herriott D.E., Hancock D.D., McKay R.W., Barrett T.J., Fleming D.W. 1997a. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *J Infect Dis.* 176(3):815-818.
- Kehl S.C. 2002. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *J. Clin. Microbiol.* 40:2711-2715.
- Keskimäki M., Saari M., Heiskanen T., Siitonen A. 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates. *J Clin Microbiol.* 36(12):3641-3646.
- Keys C., Kemper S., Keim P. 2005. Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing. *J Appl Microbiol.* 98(4):928-940.

- Khakhria R., Duck D., Lior H. 1990. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.* 105:511-520.
- Khan A.B., Naim A., Orth D., Grif K., Mohsin M., Prager R., Dierich M.P., Würzner R. 2009. Serine protease espP subtype alpha, but not beta or gamma, of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is associated with highly pathogenic serogroups. *Int J Med Microbiol.* 299(4):247-254.
- Kikuchi K., Ueno H., Tomari K., Kobori S., Kaetsu A., Miyazaki M. 2014. Identification of resistance and susceptibility to cefotaxime in EHEC O121 strains isolated from an outbreak at two nurseries. *Kansenshogaku Zasshi*88:430-437.
- Kim J., Oh K., Jeon S., Cho S., Lee D., Hong S., Cho S., Park M., Jeon D., Kim S. 2011. *Escherichia coli* O104:H4 from 2011 European outbreak and strain from South Korea. *Emerg Infect Dis.* 17(9):1755-1756.
- Kleanthous H., Smith H.R., Scotland S.M., Gross R.J., Rowe B., Taylor C.M., Milford D.V. 1990. Haemolytic uraemic syndromes in British Isles, 1985-8: association with verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. 2. Microbiological aspects. *Arch. Dis. Child.* 65:722-727.
- Kobayashi H., Miura A., Hayashi H., Ogawa T., Endô T., HataE., Eguchi M., and Yamamoto K. 2003. Prevalence and characteristics of *eae*-positive *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5690-5962.
- Kobayashi H., Kanazaki M., Hata E., Kubo M. 2008. Prevalence and characteristics of *eae*- and *stx*- positive strains of *Escherichia coli* from wild birds in the immediate environment of Tokyo Bay. *Applied and Environmental Microbiology.* 292-295.
- Kobayashi I., Shimada J., Nakazawa M., Morozumi T., Pohjanvirta T., Pelkonen S., Yamamoto K. 2001. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:484-489.
- Kobayashi N., Lee K., Yamazaki A., Saito S., Furukawa I., Kono T., Maeda E., Isobe J., Sugita-Konishi Y., Hara-Kudo Y. 2013. Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 51(12):4022-4028.
- Koch C., Hertwig S., Lurz R., Appel B., Beutin L. 2001. Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx1OX3* gene, which is closely associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans. *J. Clin. Microbiol.* 39:3992-3998.
- Köhler C.D., Dobrindt U. 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol.* 301:642-647.
- Konowalchuk J., Spiers J.I., and Stavric S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:775-779.
- Kramarenko T., Roasto M., Mäesaar M., Maugliani A., Tozzoli R., Meremäe K., Elias T., Kuningas M. 2016. Phenogenotypic Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 Strains Isolated from Cattle at Slaughter. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 16(11):703-708.
- Krause G., Zimmermann S., Beutin L. 2005. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet. Microbiol.* 20:87-95.
- Krause U., Thomson-Carter F.M., Pennington T.H. 1996. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing. *J. Clin. Microbiol.* 34:959-961.
- Krüger A., Lucchesi P.M., Sanso A.M., Etcheverría A.I., Bustamante A.V., Burgán J., Fernández L., Fernández D., Leotta G., Friedrich A.W., Padola N.L., Rossen J.W. 2015. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated from animal, food, and clinical samples. *Front Cell Infect Microbiol.* 5:74.
- Kruis W. 2004. Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20 Suppl 4:75-78. Review.
- Kudva I.T., Hatfield P.G., Hovde C.J. 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 34:431-433.
- Kudva I.T., Hatfield P.G., Hovde C.J. 1997. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 35:892-899.
- Kumar A., Taneja N., Sharma R.K., Sharma H., Ramamurthy T., Sharma M. 2014. Molecular characterization of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* isolated from diverse sources from India by multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA). *Epidemiol Infect.* 14:1-11.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 17(12):1244-1245.
- Kuo K.H., Khan S., Rand M.L., Mian H.S., Brnjac E., Sandercock L.E., Akula I., Julien J.P., Pai E.F., Chesney A.E. 2016. EspP, an Extracellular Serine Protease from Enterohemorrhagic *E. coli*, Reduces Coagulation Factor Activities, Reduces Clot Strength, and Promotes Clot Lysis. *PLoS One.* 11(3):e0149830.
- La Ragione R.M., Ahmed N.M.Y., Best A., Clifford D., Weyer U., Cooley W.A., Johnson L., Pearson G.R., Woodward M.J. 2005. Colonization of 8-week-old conventionally reared goats by *Escherichia coli* O157:H7 after oral inoculation. *J. Med. Microbiol.* 54:485-492.
- Lafolie J., Sauget M., Cabrolier N., Hocquet D., Bertrand X. 2015. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? *J Hosp Infect.* 90(3):208-212.

- Laidler M.R., Tourdjman M., Buser G.L., Hostetler T., Repp K.K., Leman R., Samadpour M., Keene W.E. 2013. *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated With Consumption of Locally Grown Strawberries Contaminated by Deer. *Clin Infect Dis.* 57(8):1129-1134.
- Lambert D., Carrillo C.D., Koziol A.G., Manninger P., Blais B.W. 2015. GeneSippr: a rapid whole-genome approach for the identification and characterization of foodborne pathogens such as priority Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One.* 10(4):e0122928.
- Lathem W.W., Grys T.E., Witowski S.E., Torres A.G., Kaper J.B., Tarr P.I., Welch R.A. 2002. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7 specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol.* 45:277-288.
- Launders N., Locking M.E., Hanson M., Willshaw G., Charlett A., Salmon R., Cowden J., Harker K.S., Adak G.K. 2016. A large Great Britain-wide outbreak of STEC O157 phage type 8 linked to handling of raw leeks and potatoes. *Epidemiol Infect.* 144(1):171-181.
- Lee J.H., Hur J., Stein B.D. 2008. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 and O111 in calves associated with diarrhea. *Veterinary Journal* 176:205-209.
- Lee M.S., Kaspar C.W., Brosch R., Shere J., Luchansky J.B. 1996. Genomic analysis using pulsed-field gel electrophoresis of *Escherichia coli* O157: H7 isolated from dairy calves during the United State National Dairy Heifer Evaluation Project (1992-1992). *Vet Microbiol.* 48(3-4):223-230.
- Lee S.H., Levy D.A., Craun G.F., Beach M.J., Calderon R.L. 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, DC, 51(8):1-47.
- Lehmacher A., Meier H., Aleksic S., Bockemühl J. 1998. Detection of hemolysin variants of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR and culture on vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2449-2453.
- Leimbach A., Hacker J., Dobrindt U. 2013. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358:3-32.
- Leomil L., Aidar-Ugrinovich L., Guth B.E.C., Irino K., Vettorato M.P., Onuma D.L., Pestana de Castro A.F. 2003. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Vet. Microbiol.* 97:103-109.
- Leomil L., de Castro A.F.P., Krause G., Schmidt H., y Beutin L. 2005. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. *FEMS Microbiology Letters*, 249(2): 335-342.
- Leotta G.A., Deza N., Origlia J., Toma C., Chinen I., Miliwebsky E., Iyoda S., Sosa-Estani S., Rivas M. 2006. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. *Vet Microbiol.* 118(1-2):151-157.
- Leotta G.A., Miliwebsky E.S., Chinen I., Espinosa E.M., Azzopardi K., Tennant S.M., Robins-Browne R.M., Rivas M. 2008. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiol.* 8:46.
- Lescat M., Clermont O., Woerther P.L., Glodt J., Dion S., Skurnik D., Djossou F., Dupont C., Perroz G., Picard B., Catzeffis F., Andreumont A., Denamur E. 2013. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environ Microbiol Rep.* 5(1):49-57.
- Levine M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389.
- Levine M.M., Nataro J.P., Karch H., Baldini M.M., Kaper J.B., Black R.E., Clements M.L., O'Brien A.D. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis.* 152(3):550-559.
- Licence K., Oates K.R., Syngé B.A., Reid T.M. 2001. An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiol Infect.* 126(1):135-138.
- Liebana E., Smith R.P., Batchelor M., McLaren I., Cassar C., Clifton-Hadley F.A., Paiba GA. 2005. Persistence of *Escherichia coli* O157 isolates on bovine farms in England and Wales. *J. Clin. Microbiol.* 43:898-902.
- Lienemann T., Salo E., Rimhanen-Finne R., Rönnholm K., Taimisto M., Hirvonen J.J., Tarkka E., Kuusi M., Siitonen A. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O78:H(-) in family, Finland, 2009. *Emerg Infect Dis.* 18(4):577-581.
- Liesegang A., Sachse U., Prager R., Claus H., Steinrück H., Aleksic S., Rabsch W., Voigt W., Fruth A., Karch H., Bockemühl J., Tschäpe H. 2000. A clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H- in Germany-A ten-year study. *International Journal of Medical Microbiology* 290, 269-278.
- Lim J.Y., Li J., Sheng H., Besser T.E., Potter K., Hovde C.J. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 Colonization at the Rectoanal Junction of Long-Duration Culture-Positive Cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1380-1382.
- Lim J.Y., Yoon J., Hovde C.J. 2010a. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol.* 20(1):5-14. Review.

- Lim J.Y., Hong J.B., Sheng H., Shringi S., Kaul R., Besser T.E., Hovde C.J. 2010b. Phenotypic diversity of *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with the plasmid O157. *J Microbiol.* 48(3):347-357.
- Lindsey R.L., Pouseele H., Chen J.C., Strockbine N.A., Carleton H.A. 2016. Implementation of Whole Genome Sequencing (WGS) for Identification and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in the United States. *Front Microbiol.* 7:766.
- Lindstedt B.A., Heir E., Gjernes E., Vardund T., Kapperud G. 2003. DNA fingerprinting of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2:12.
- Lindstedt B.A., Vardund T., Kapperud G. 2004. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods.* 58(2):213-222.
- Lindstedt B.A., Brandal L.T., Aas L., Vardund T., Kapperud G. 2007. Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *J Microbiol Methods.* 69(1):197-205.
- Liptáková A., Siegfried L., Podracká L., Sabol M., Sehnáková H., Bogyiová E., Rosocha J., Kmetová M., Kerestesová H., Kotulová D. 2002. Detection of Shiga toxins, intimin and enterohemolysin in *Escherichia coli* strains isolated from children in eastern Slovakia. *Folia Microbiol (Praha).* 47(2):185-188.
- Liptakova A., Siegfried L., Rosocha J., Podracka L., Bogyiova E., Kotulova D. 2004. A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurised cow's milk in Slovakia. *Clin Microbiol Infect.* 10(6):576-578.
- Liu Y., DebRoy C., Fratamico P. 2007. Sequencing and analysis of the *Escherichia coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences. *Mol Cell Probes.* 21(4):295-302.
- Liu Y., Fratamico P., Debroy C., Bumbaugh A.C., Allen J.W. 2008. DNA sequencing and identification of serogroup-specific genes in the *Escherichia coli* O118 O antigen gene cluster and demonstration of antigenic diversity but only minor variation in DNA sequence of the O antigen clusters of *E. coli* O118 and O151. *Foodborne Pathog Dis.* 5(4):449-457.
- Lockary V.M., Hudson R.F., Ball C.L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Idaho. *Emerging Infectious Diseases,* 13(8):1262-1264.
- Loirat C. 2013. Hemolytic uremic syndrome caused by Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Rev Prat.* 63(1):11-16. Review.
- Lopes R.B., Faria M., Souza D.A., Bloch C., Jr., Silva L.P., Humber R.A. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from *Metarhizium anisopliae* complex. *Mycologia* 106, 865-878. 10.3852/13-401.
- López C. 2004. Serotipos, genes de virulencia, tipos de intiminas y perfiles de PFGE de *Escherichia coli* verotoxigénicos aislados de carne de vacuno. Proyecto fin de carrera de Enxeñeiro Agrónomo. Escola Politécnica Superior de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela.
- López C. 2006. Tipado molecular (PFGE) de cepas del *Escherichia coli* verotoxigénico O157:H7. Trabajo de investigación para obtención de Diploma de Estudios Avanzados (DEA) por el Programa de Doctorado de Microbiología e Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela en el curso 2005-2006.
- López C., Dahbi G., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Pita J.M., Alonso M.P., Coira M.A., Herrera A., Echeita M.A., Blanco J. 2007. Prevalencia, serotipos, fagotipos, genes de virulencia, tipos de intiminas y perfiles de PFGE de *Escherichia coli* diarreagénicos en coprocultivos (2006). Comunicación 296. XII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), A Coruña, 9-11 de Mayo 2007. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25 (Espec Congr): 109.
- Losada A. 2005. Serotipos, genes de virulencia y tipado de intiminas de *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECTV) y enteropatogénicos (ECEP). Facultad de Ciencias de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- Louie M., de Azavedo J., Clarke R., Borczyk A., Lior H., Richter M., Brunton J. 1994. Sequence heterogeneity of the eae gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol Infect.* 112(3):449-461.
- Louie M., Read S., Simor A.E., Holland J., Louie L., Ziebell K., Brunton J., Hii J. 1998. Application of multiplex PCR for detection of non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in bloody stools: identification of serogroups O26 and O111. *J. Clin. Microbiol.* 36:3375-3377.
- Louie M., Read S., Louie L., Ziebell K., Rahn K., Borczyk A., Lior H. 1999. Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol. Infect.* 123:17-24.
- Lucchesi P.M., Kruger A., Parma A.E. 2006. Distribution of saa gene variants in verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and food. *Res Microbiol.* 157:263-266.
- Luo C., Walk S.T., Gordon D.M., Feldgarden M., Tiedje J.M., Konstantinidis K.T. 2011. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(17):7200-7205.
- Luzzi I., Tozzi A.E., Rizzoni G., Niccolini A., Benedetti I., Minelli F., Caprioli A. 1995. Detection of serum antibodies to the

- lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O103 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J Infect Dis.* 171(2):514-515.
- MacDonald D.M., Fyfe M., Paccagnella A., Trinidad A., Louie K., Patrick D. 2004. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiol Infect.* 132(2):283-289.
- MacDonald E., Dalane P.K., Aavitsland P., Brandal L.T., Wester A.L., Vold L. 2014. Implications of screening and childcare exclusion policies for children with Shiga-toxin producing *Escherichia coli* infections: lessons learned from an outbreak in a daycare centre, Norway, 2012. *BMC Infect Dis.* 14:673.
- Mackenzie A.M.R., Lebel P., Orrbine E., Rowe P.C., Hyde L., Chan F., Hohnson W., McLaine P.N., and the Synsorb Pk Study Investigators. 1998. Sensitivities and specificities of Premier *E. coli* O157 and Premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 36:1608-1611.
- Madic J., Lecureuil C., Dilasser F., Derzelle S., Jamet E., Fach P., Auvray F. 2009. Screening of food raw materials for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Lett Appl Microbiol.* 48(4):447-451.
- Madic J., Vingadassalon N., de Garam C.P., Marault M., Scheutz F., Brugere H., Jamet E., Auvray F. 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk chesse by using multiplex real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:2035-2041.
- Madzingira O. 2016. Shiga toxin-producing *E. coli* isolated from sheep in Namibia. *J Infect Dev Ctries.* 10(4):400-403.
- Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(6):3140-3145.
- Maidhof H, Guerra B, Abbas S, Elsheikha HM, Whittam TS, Beutin L. 2002. A multiresistant clone of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O118:[H16] is spread in cattle and humans over different European countries. *Appl Environ Microbiol.* 68(12):5834-5842.
- Mainil J. 1999. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.* 30:235-257.
- Mainil J.G., Daube G. 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol.* 98(6):1332-1344. Review.
- Mainil J.G., Duchesnes C.J., Whipp S.C., Marques L.R., O'Brien A.D., Casey T.A., Moon H.W. 1987. Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am J Vet Res.* 48(5):743-748.
- Makino K., Ishii K., Yasunaga T., Hattori M., Yokoyama K., Yutsudo C.H., Kubota Y., Yamaichi Y., Iida T., Yamamoto K. 1998. Complete Nucleotide Sequences of 93-kb and 3.3-kb Plasmids of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Derived from Sakai Outbreak. *DNA Res.* 5:1-9.
- Makino S., Kobori H., Asakura H., Watarai M., Shirahata T., Ikeda T., Takeshi K., Tsukamoto T. 2000. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiol Infect.* 125(1):55-61.
- Malik A., Tóth I., Beutin L., Schmidt H., Taminiau B., Dow M.A., Marabito S., Oswald E., Mainil J., Nagy B. 2006. Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of eae+ *Escherichia coli* from weaned pigs. *Vet. Microbiol. Vet. Microbiol.* 114:82-93.
- Manges A.R. 2016. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clin Microbiol Infect.* 22(2):122-129.
- Manna S.K., Manna C., Batabyal K., Das B., Golder D., Chattopadhyay S., Biswas B.K. 2010. Serogroup distribution and virulence characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* from food and cattle stool. *J Appl Microbiol.* 108(2):658-665.
- March S.B., y Ratman S. 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 23: 869-872.
- Marder E.P., Garman K.N., Ingram L.A., Dunn J.R. 2014. Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Bagged Salad. *Foodborne Pathog Dis.* 11(8):593-595.
- Marejková M., Bláhová K., Janda J., Fruth A., Petráš P. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as Causes of Hemolytic Uremic Syndrome in the Czech Republic. *PLoS One.* 8(9):e73927.
- Mariani-Kurkdjian P., Denamur E., Milon A., Picard B., Cave H., Lambert-Zechovsky N., Loirat C., Goulet P., Sansonetti P.J., Elion J. 1993. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J Clin Microbiol.* 31(2):296-301. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 1994 Mar; 32(3):860.
- 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(1):99-104.
- Martin M.L., Shipman L.D., Wells J.G., Potter M.E., Hedberg K., Wachsmuth I.K., Tauxe R.V., Davis J.P., Arnoldi J., Tilleli J. 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* ii: 1043.
- Martínez R., Sánchez S., Rey J., Alonso JM. 2010. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated

- from patients in Cáceres, Extremadura (Spain) (2006-2007). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28(2):136-137.
- Martins F.H., Guth B.E., Piazza R.M., Blanco J., Pelayo J.S. 2014. First description of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 strain isolated from sheep in Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 8(1):126-128.
- Masana M.O., Leotta G.A., Del Castillo L.L., D'Astek B.A., Palladino P.M., Galli L., Vilacoba E., Carbonari C., Rodríguez H.R., Rivas M. 2010. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J Food Prot.* 73(4):649-656.
- Matthews L., Reeve R., Gally D.L., Low J.C., Woolhouse M.E., McAteer S.P., Locking M.E., Chase-Topping M.E., Haydon D.T., Allison L.J., Hanson M.F., Gunn G.J., Reid S.W. 2013. Predicting the public health benefit of vaccinating cattle against *Escherichia coli* O157. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(40):16265-6270.
- Maule A. 1999. Environmental survival of *Escherichia coli* O157: Implications for spread of disease. En: Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe, 2. Survival and Growth of Verocytotoxigenic *E. coli*. Concerted Action CT98-3935. Eds. Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., McDowell D.A. Teagasc, The National Food Centre, Dublin. 8-17.
- Maurer J.J., Schmidt D., Petrosko P., Sanchez S., Bolton L., Lee M.D. 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2954-2960.
- Mazaheri S., Salmanzadeh Ahrabi S., Aslani M.M. 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from lettuce samples in Tehran, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 7(11):e12346.
- McCarthy T.A., Barrett N.L., Hadler J.L., Salsbury B., Howard R.T., Dingman D.W., Brinkman C.D., Bibb W.F., Cartter M.L. 2001. Hemolytic-Uremic Syndrome and *Escherichia coli* O121 at a Lake in Connecticut, 1999. *Pediatrics.* 108(4):E59.
- McCluskey B.J., Rice D.H., Hancock D.D., Hovde C.J., Besser T.E., Gray S., Johnson R.P. 1999. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and other Shiga-toxin-producing *E. coli* in lambs at slaughter. *J Vet Diagn Invest.* 11(6):563-565.
- McDowell D.A., Sheridan J.J. 2001. Survival and growth of Verocytotoxin-producing *E. coli* in the environment, in Verocytotoxigenic *Escherichia coli*, eds Duffy G., Garvey P., McDowell D., editors. (Trumbull, CT: Food and Nutrition Press Inc), 279-304.
- McIntyre L., Fung J., Paccagnella A., Isaac-Renton J., Rockwell F., Emerson B., Preston T. 2002. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Can Commun Dis Rep.* 28(1):6-8.
- McLean C., Bettelheim K.A., Kuzevski A., Falconer L., Djordjevic S.P. 2005. Isolation of *Escherichia coli* O5:H-, possessing genes for Shiga toxin 1, intimin-beta and enterohaemolysin, from an intestinal biopsy from an adult case of bloody diarrhoea: evidence for two distinct O5:H- pathotypes. *J Med Microbiol.* 54(Pt 6):605-607.
- McNally A., Roe A.J., Simpson S., Thomson-Carter F.M., Hoey D.E., Currie C., Chakraborty T., Smith D.G., Gally D.L. 2001. Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine *Escherichia coli* O157. *Infect Immun.* 69(8):5107-5114. Retraction in: McNally A, Roe AJ, Simpson S, Thomson-Carter FM, Hoey DE, Currie C, Chakraborty T, Smith DG, Gally DL. *Infect Immun.* 2005. 73(4):2571.
- Mead P.S., Griffin P.M. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352:1207-1212.
- Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5(5):607-625.
- Meichtri L., Miliwebsky E., Gioffré A., Chinen I., Baschkier A., Chillemi G., Guth B.E., Masana M.O., Cataldi A., Rodríguez H.R., Rivas M. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol.* 96(2):189-198.
- Mekata H, Iguchi A, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I, Misawa N. 2014. Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. *J Food Prot.* 77(8):1269-1274.
- Mellmann A., Bielaszewska M., Köck R., Friedrich A.W., Fruth A., Middendorf B., Harmsen D., Schmidt M.A., Karch H. 2008a. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 14(8):1287-1290.
- Mellmann A., Lu S., Karch H., Xu J.G., Harmsen D., Schmidt M.A., Bielaszewska M. 2008b. Recycling of Shiga toxin 2 genes in sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Appl Environ Microbiol* 74:67-72.
- Mellmann A., Fruth A., Friedrich A.W., Wieler L.H., Harmsen D., Werber D., Middendorf B., Bielaszewska M., Karch H. 2009. Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. *Emerg Infect Dis.* 15(9):1474-1477.
- Meng J., Zhao S., Zhao T., Doyle M.P. 1995. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from raw milk, ground beef, and calf feces using pulsed field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis. *J. Med. Microbiol.* 42:258-263.
- Meng J., Zhao S., Doyle M.P. 1998. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. *Inter. J. Food. Microbiol.* 45:229-235.
- Meng Q., Bai X., Zhao A., Lan R., Du H., Wang T., Shi C., Yuan X., Bai X., Ji S., Jin D., Yu B., Wang Y., Sun H., Liu K., Xu J.,

- Xiong Y. 2014. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China. *BMC Microbiol.* 14:5.
- Mercado E.C., Gioffre A., Rodríguez S.M., Cataldi A., Irino K., Elizondo A.M., Cipolla A.L., Romano M.I., Malena R., Méndez M.A. 2004. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *J. Vet. Med. B* 51:82-88.
- Merkel V., Ohder B., Bielaszewska M., Zhang W., Fruth A., Menge C., Borrmann E., Middendorf B., Müthing J., Karch H., Mellmann A. 2010. Distribution and phylogeny of immunoglobulin-binding protein G in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its association with adherence phenotypes. *Infect Immun.* 78(8):3625-3636.
- Micenková L., Bosák J., Vrba M., Sevcikova A., Smajs D. 2016. Human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants. *BMC Microbiol.* 16:218.
- Michelacci V., Tozzoli R., Caprioli A., Martínez R., Scheutz F., Grande L., Sánchez S., 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 Infect.* 19(3):E149-156.
- Michino H., Araki K., Minami S., Takaya S., Sakai N., Miyazaki M., Ono A., Yanagawa H. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150(8): 787-796.
- Miko A., Pries K., Haby S., Steege K., Albrecht N., Krause G., Beutin L. 2009. Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. *Appl Environ Microbiol.* 75(20):6462-6470.
- Miko A., Lindstedt B.A., Brandal L.T., Løbersli I., Beutin L. 2010. Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains. *FEMS Microbiol Lett.* 303(2):137-146.
- Miko A., Delannoy S., Fach P., Strockbine N.A., Lindstedt B.A., Mariani-Kurkdjian P., Reetz J., Beutin L. 2013. Genotypes and virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 strains from different origins and sources. *Int J Med Microbiol.* 303(8):410-421
- Milkman R., Crawford I.P. 1983. Clústered third-base substitutions among wild strains of *Escherichia coli*. *Science* 221:378 380.
- Milon A., Oswald E., De Rycke J. 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res.* 30(2-3):203-219. Review.
- Misselwitz J, Karch H, Bielazewska M, John U, Ringelmann F, Rönnefarth G, Patzer L. 2003. Cluster of hemolytic-uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11. *Pediatr Infect Dis J.* 22(4):349-354.
- Mohammad A., Peiris J.S.M., Wijewanta E.A. 1986. Serotypes of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and buffalo calf diarrhoea. *FEMS Microbiol Lett.* 35:261-265.
- Mohammadi P., Abiri R., Rezaei M., Salmazadeh-Ahrabi S. 2013. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk in Kermanshah, Iran. *Iran J Microbiol.* 5(3):233-238.
- Moissenet D., Salauze B., Clermont O., Bingen E., Arlet G., Denamur E., Mérens A., Mitanchez D., Vu-Thien H. 2010. Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. *J Clin Microbiol* 48:2459 2463.
- Møller Nielsen E., Jensen C., Lau Baggesen D. 2005. Evidence of transmission of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O111 from a cattle stable to a child. *Clin Microbiol Infect.* 11(9):767-770.
- Monaghan A., Byrne B., Fanning S., Sweeney T., McDowell D., Bolton D.J. 2011. Serotypes and virulence profiles of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. *Appl Environ Microbiol.* 77(24):8662-8668.
- Montenegro M.A., Bülte M., Trumpf T., Aleksic S., Reuter G., Bulling E., Helmuth R. 1990. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 28:1417-1421.
- Mora A. 2002. *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) O157:H7 y no O157. Prevalencia, serotipos, fagotipos, genes de virulencia, tipos de intiminas, perfiles de PFGE y resistencia a antibióticos de ECVT de origen humano y animal. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Mora A., Blanco J.E., Blanco M., Dhahi G., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I., Blanco J. 2003. Serotypes, virulence genes and intimins of VTEC isolated from raw beef products in Spain. 5th International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* infections". Edinburgh. Final programme and Book of Abstracts, P27 abstract, p. 90.
- Mora A., Blanco M., Blanco J.E., Alonso M.P., Dhahi G., Thomson-Carter F., Usera M.A., Bartolomé R., Prats G., Blanco J. 2004. Phage types and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). *J Clin Microbiol.* 42(9):4007-4015.
- Mora A., Blanco J.E., Blanco M., Alonso M.P., Dhahi G., Echeita A., González E.A., Bernárdez M.I., Blanco J. 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res. Microbiol.* 156:793-806.

- Mora A., Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., López C., Justel P., Alonso M.P., Echeita A., Bernárdez M.I., González E.A., Blanco J. 2007a. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiol.* 7:13.
- Mora A., León S.L., Blanco M., Blanco J.E., López C., Dahbi G., Echeita A., González E.A., Blanco J. 2007b. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *Int J Food Microbiol.* 114(2):204-210.
- Mora A., Blanco M., Yamamoto D., Dahbi G., Blanco J.E., López C., Alonso M.P., Vieira M.A.M., Hernández R.T., Abe C.M., Piazza R.M.F., Lacher D.W., Elias W.P., Gomes T.A.T., Blanco J. 2009. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. *International Microbiology*, 12(4):243-251.
- Mora A., Herrera A., Mamani R., López C., Alonso M.P., Blanco J.E., Blanco M., Dahbi G., García-Garrote F., Pita J.M., Coira A., Bernárdez M.I., Blanco J. 2010. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Appl Environ Microbiol.* 76(21):6991-6997.
- Mora A., Herrera A., López C., Dahbi G., Mamani R., Pita J.M., Alonso M.P., Llovo J., Bernárdez M.I., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J. 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(3):121-141. Review.
- Mora A., López C., Dahbi G., López-Beceiro A.M., Fidalgo L.E., Díaz E.A., Martínez-Carrasco C., Mamani R., Herrera A., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J. 2012a. Seropathotypes, Phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Appl Environ Microbiol.* 78(8):2578-2585.
- Mora A., López C., Herrera A., Viso S., Mamani R., Dahbi G., Alonso M.P., Blanco M., Blanco J.E., Blanco J. 2012b. Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111:H4-D-ST2085 and O111:H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential. *Vet Microbiol.* 156(3-4):347-352.
- Mora A., Viso S., López C., Alonso M.P., García-Garrote F., Dahbi G., Mamani R., Herrera A., Marzoa J., Blanco M., Blanco J.E., Moulin-Schouleur M., Schouler C., Blanco J. 2013. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. *Vet Microbiol.* 167(3-4):506-512.
- Morabito S., Karch H., Mariani-Kurkdjian P., Schmidt H., Minelli F., Bingen E., Caprioli A. 1998. Enteroggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 36(3):840-842.
- Morabito S., Karch H., Schmidt H., Minelli F., Mariani-Kurkdjian P., Allerberger F., Bettelheim K.A., Caprioli A. 1999. Molecular characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serogroup O111 from different countries. *J. Med. Microbiol.* 48:891-896.
- Morabito S., Dell'Omo G., Agrimi U., Schmidt H., Karch H., Cheasty T., Caprioli A. 2001. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet Microbiol.* 82(3):275-283.
- Morato E.P., Leomil L., Beutin L., Krause G., Moura R.A., Pestana de Castro A.F. 2008. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. *Zoonoses Public Health.* 56:229-237.
- Morgan D., Newman C.P., Hutchinson D.N., Walker A.M., Rowe B., Majid F. 1993. Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect.* 111:181-187.
- Morgan G.M., Newman C., Palmer S.R., Allen J.B., Shepherd W., Rampling A.M., Warren R.E., Gross R.J., Scotland S.M., Smith H.R. 1988. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. *Epidemiol Infect.* 101(1):83-91.
- Moura R.A., Sircili M.P., Leomil L., Matté M.H., Trabulsi L.R., Elias W.P., Irino K., Pestana de Castro A.F. 2009. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. 75:7399-7408.
- Much P., Pichler J., Kasper S.S., Allerberger F. 2009. Foodborne outbreaks, Austria 2007. *Wien Klin Wochenschr.* 121(3-4):77-85.
- Mueller J.E., Zweifel C., Corti S., Blanco J.E., Stephan R. 2003. Microbiological quality of Raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. Dairy Sci.* 86:3849-3856.
- Müller D., Hagedorn P., Brast S., Heusipp G., Bielaszewska M., Friedrich A.W., Karch H., Schmidt M.A. 2006. Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. *J Clin Microbiol.* 44(7):2626-2629.
- Mullis K.B., Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
- Muniesa M., Jofre J. 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(7):2443-2448.

- Muniesa M., de Simon M., Prats G., Ferrer D., Pañella H., Jofre J. 2003. Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect Immun.* 71(8):4554-4562.
- Muniesa M., Blanco J.E., De Simón M., Serra-Moreno R., Blanch A.R., Jofre J. 2004. Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology.* 150(Pt9):2959-2971.
- Muraoka R., Okazaki M., Fujimoto Y., Jo N., Yoshida R., Kiyoyama T., Oura Y., Hirakawa K., Jyukurogi M., Kawano K., Okada M., Shioyama Y., Iryoda K., Wakamatu H., Kawabata N. 2007. An enterohemorrhagic *Escherichia coli* O103 outbreak at a nursery school in Miyazaki Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 60(6):410-411.
- Murphy M., Minihan D., Buckley J.F., O'Mahony M., Whyte P., Fanning S. 2008. Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of Irish verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from feedlot cattle: uncovering strain dissemination routes. *BMC Vet Res.* 4:2.
- Nagano H., Hirochi T., Fujita K., Wakamori Y., Takeshi K., Yano S. 2004. Phenotypic and genotypic characterization of beta-D-glucuronidase-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer. *J Med Microbiol.* 53(Pt 10):1037-1043.
- Nagano I., Kunishima M., Itoh Y., Wu Z., Takahashi Y. 1998. Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 42:371-376.
- Nakazato G., Gyles C., Ziebell K., Keller R., Trabulsi L. R., Gomes T.A.T., Irino K., Dias da Silveira W., y Pestana de Castro A. 2004. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Veterinary Microbiology,* 101(4): 269-277.
- Nash J.H., Villegas A., Kropinski A.M., Aguilar-Valenzuela R., Konczy P., Mascarenhas M., Ziebell K., Torres A.G., Karmali M.A., Coombes B.K. 2010. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics.* 11:667.
- Nataro J.P., Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11(1):142-201. Review. Erratum in: *Clin Microbiol Rev* 1998 Apr;11(2):403.
- National Institute of Infectious Diseases, Japan. 2012. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan as of April 2012. *Infectious Agents Surveillance Report (IASR).*
- Naylor S.W., Low J.C., Besser T.E., Mahajan A., Gunn G.J., Pearce M.C., McKendrick I.J., Smith D.G., Gally D.L. 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun.* 71(3):1505-1512.
- Nei M. and Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press, New York.
- Newton H.J., Sloan J., Bulach D.M., Seemann T., Allison C.C., Tauschek M., Robins-Browne R.M., Paton J.C., Whittam T.S., Paton A.W., Hartland E.L. 2009. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. *Emerg. Infect. Dis.* 15:372-380.
- Nguyen R.N., Taylor L.S., Tauschek M., Robins-Browne R.M. 2006. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg Infect Dis.* 12(4):597-603.
- Nielsen E.M., Tegtmeier C., Jorgen Andersen H., Gronbaek C., Andersen J.S. 2002. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet. Microbiol.* 88:245-257.
- Nielsen E.M., Skov M.N., Madsen J.J., Lodal J., Jespersen J.B., Baggesen D.L. 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Appl Environ Microbiol.* 70(11):6944-6947.
- Nielsen E.M., Scheutz F., Torpdahl M. 2006. Continuous surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by pulsed-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic. *Foodborne Pathog Dis.* 3(1):81-87.
- Nishikawa, Hase A., Ogasawara J., Cheasty T., Willshaw G.A., Smith H.R., Tatsumi Y., Yasukawa A. 2001. Phage typing and DNA-based comparison of strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 from apparently sporadic infections in Osaka city, Japan, 1996. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54:140-143.
- Nissen H., Nesbakken T. 2001. Control of VTEC in the meat industry. En: *Verocytotoxigenic E. coli.* Eds. Duffy G., Garvey P., McDowell A. Food and Nutrition Press. USA. 367-380.
- Noller A.C., McEllistrem M.C., Pacheco A.G., Boxrud D.J., Harrison L.H. 2003. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Clin Microbiol.* 41(12):5389-5397. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2004 Feb;42(2):940.
- Norman K.N., Clawson M.L., Strockbine N.A., Mandrell R.E., Johnson R., Ziebell K., Zhao S., Fratamico P.M., Stones R., Allard M.W., Bono J.L. 2015. Comparison of whole genome sequences from human and non-human *Escherichia coli* O26 strains. *Front Cell Infect Microbiol.* 5:21.
- Novello A. 1999. Public health dispatch: outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington County Fair-New York, 1999. *Morbidity Mortality and Weekly Report,* 48:803-804.
- Nüesch-Inderbinnen M.T., Funk J., Cernela N., Tasara T., Klumpp J., Schmidt H., Stephan R. 2015. Prevalence of subtilase cytotoxin-encoding subAB variants among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from wild ruminants and sheep differs from that of cattle and pigs and is

- predominated by the new allelic variant subAB2-2. *Int J Med Microbiol.* 305(1):124-128.
- Núñez M. 2003. Prevalencia, serotipos y genes devirulencia de *Escherichia coli* verotoxigénicos en carne de vacuno. Proyecto Fin de Carrera de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela.
- Oanh T.K., Nguyen V.K., Do T.N., Goddeeris B.M., De Greve H. 2010. *Escherichia coli* strains causing edema disease in northern Vietnam share an identical verotoxin 2e. *Trop Anim Health Prod.* 42(8):1797-804.
- Oanh T.K., Nguyen V.K., De Greve H., Goddeeris B.M. 2012. Protection of piglets against Edema disease by maternal immunization with Stx2e toxoid. *Infect Immun.* 80(1):469-473.
- O'Brien A.D., Holmes R.K. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev.* 51(2):206-220. Review.
- O'Brien A.D., Marques L.R.M., Kerry C.F., Newland J.W., Holmes R.K. 1989. Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933. *Microb. Pathog.* 6:381-390.
- Ogura Y., Kurokawa K., Ooka T., Tashiro K., Tobe T., Ohnishi M., Nakayama K., Morimoto T., Terajima J., Watanabe H., Kuhara S., Hayashi T. 2006. Complexity of the genomic diversity in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai OligoDNA microarray and the Whole Genome PCR scanning. *DNA Res.* 13(1):3-14.
- Ogura Y., Ooka T., Iguchi A., Toh H., Asadulghani M., Oshima K., Kodama T., Abe H., Nakayama K., Kurokawa K., Tobe T., Hattori M., Hayashi T. 2009. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17939-17944.
- Ogura Y., Mondal S.I., Islam M.R., Mako T., Arisawa K., Katsura K., Ooka T., Gotoh Y., Murase K., Ohnishi M., Hayashi T. 2015. The Shiga toxin 2 production level in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage. *Sci Rep.* 5:16663.
- Ojer-Usoz E., González D., Vitas A.I. 2017. Clonal Diversity of ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Environmental, Human and Food Samples. *Int J Environ Res Public Health.* 14(7). pii: E676.
- Oklahoma State Department of Health. 2009. Epidemiological investigation of restaurant-associated *Escherichia coli* O111:NM outbreak- Mayes County, Oklahoma, 2008. Final report. (<https://www.ok.gov/health2/documents/OOC-EcoliO111SummaryReport.pdf>).
- Olesen B., Jensen C., Olsen K., Fussing V., Gerner-Smidt P., Scheutz F. 2005. VTEC O117:K1:H7. A new clonal group of *E. coli* associated with persistent diarrhoea in Danish travellers. *Scand J Infect Dis.* 37(4):288-294.
- Oliveira M.G., Brito J.R., Carvalho R.R., Guth B.E., Gomes T.A., Vieira M.A., Kato M.A., Ramos I.L., Vaz T.M., Irino K. 2007. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 73(18):5945-5948.
- Olsen S.J., Miller G., Breuer T., Kennedy M., Higgins C., Walford J., McKee G., Fox K., Bibb W., Mead P. 2002. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg Infect Dis.* 8(4):370-375.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2005. The treatment of diarrhoea. Manual for physicians and other senior health workers. 4th rev: 44.
- Onoue Y., Konuma H., Nakagawa H., Hara-Kudo Y., Fujita T., Kumagai S. 1999. Collaborative evaluation of detection methods for *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts and ground beef. *Int J Food Microbiol.* 46(1):27-36.
- Ooka T., Terajima J., Kusumoto M., Iguchi A., Kurokawa K., Ogura Y., Asadulghani M., Nakayama K., Murase K., Ohnishi M., Iyoda S., Watanabe H., Hayashi T. 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J Clin Microbiol.* 47(9):2888-2894.
- Orden J.A., Cid D., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Garcia S., Martínez S., y De la Fuente R. 2002. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrototoxic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 93(1): 29-35.
- Orden J.A., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Cid D., González E.A., Blanco J., de la Fuente R. 2003. Prevalence and characterization of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. *Epidemiol Infect.* 130(2):313-321.
- Orden J.A., Cortés C., Horcajo P., De la Fuente R., Blanco J.E., Mora A., López C., Blanco J., Contreras A., Sánchez A., Corrales J.C., Domínguez-Bernal G. 2008. A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds. *Vet Microbiol.* 132(3-4):428-434.
- Orden J.A., Horcajo P., de la Fuente R., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Domínguez-Bernal G., Carrión J. 2011. Subtilase cytotoxin-encoding genes in verotoxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and goats differ from those from cattle. *Appl Environ Microbiol.* 77(23):8259-8264.
- Orden J.A., Domínguez-Bernal G., de la Fuente R., Carrión J. 2016. Subtilase cytotoxin-encoding subAB2 variants in verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from goats and sheep. *Res Vet Sci.* 105:74-76.
- Orr P., Lorencz B., Brown R., Kielly R., Tan B., Holton D., Clugstone H., Lugtig L., Pim C., Macdonald S., Hammond G., Moffatt M., Spika J., Manuel D., Winther W., Milley D., Lior H., Sinuff N. 1994. An outbreak of diarrhea due to verotoxin-

- producing *Escherichia coli* in the canadian northwest-territories. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 26(6):675-684.
- Orskov F. 1951. On the occurrence of *E. coli* belonging to O-group 26 in cases of infantile diarrhoea and white scours. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 29:373-378.
- Orskov F., Orskov I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. Methods in Microbiology. En: Bergan T. Ed. Academic Press, Nueva York. 14:43-112.
- Orskov F., Orskov I., Evans D.J. Jr, Sack R.B., Sack D.A., Wadström T. 1976. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. Med Microbiol Immunol 162:73-80.
- Orskov F., Orskov I., Jann B., Jann K. 1977. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacteriol. Rev. 41:667-710.
- Orth D., Grif K., Fisher I., Fruth A., Tschäpe H., Scheutz F., Dierich M.P., Würzner R. 2006. Emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in Europe: O100:H- and O127:H40. Curr Microbiol. 53(5):428-429.
- Orth D., Grif K., Dierich M.P., Würzner R. 2007. Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans, animals and food. Res Microbiol. 158(2):105-111.
- Orth D., Ehrlenbach S., Brockmeyer J., Khan A.B., Huber G., Karch H., Sarg B., Lindner H., Würzner R. 2010. EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. Infect Immun. 78(10):4294-4301.
- Osek J. 2003. Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. J Appl Microbiol. 95(6):1217-1225.
- Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marches O., Caprioli A. 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant. Infection and Immunity, 68(1):64-71.
- Oswald-Richter K.A., Beachboard D.C., Seeley E.H., Abraham S., Shepherd B.E., Jenkins C.A., Culver D.A., Caprioli R.M., Drake W.P. 2012. Dual analysis for mycobacteria and propionibacteria in sarcoidosis BAL. J. Clin. Immunol. 32, 1129-1140.
- Otero V., Rodríguez-Calleja J.M., Otero A., García-López M.L., Santos J. A. 2013. Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 79(19):5864-5869.
- Paciorek J. 2002. Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. J Med Microbiol. 51(7):548-556.
- Paddock Z.D., Bai J., Shi X., Renter D.G., Nagaraja T.G. 2013a. Detection of *Escherichia coli* O104 in the feces of feedlot cattle by a multiplex PCR assay designed to target major genetic traits of the virulent hybrid strain responsible for the 2011 German outbreak. Appl Environ Microbiol. 79(11):3522-3525.
- Paddock Z.D., Renter D.G., Cull C.A., Shi X., Bai J., Nagaraja T.G. 2013b. *Escherichia coli* O26 in feedlot cattle: fecal prevalence, isolation, characterization, and effects of an *E. coli* O157 vaccine and a direct-fed microbial. Foodborne Pathog. Dis. 11, 186-193.
- Padola N.L., Sanz M.E., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Etcheverría A.I., Arroyo G.H., Usera M.A., Parma A.E. 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. Vet Microbiol. 100(1-2):3-9.
- Page A.V., Liles W.C. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. Med Clin North Am. 97(4):681-695, xi.
- Pai C.H., Ahmed N., Lior H., Johnson W.M., Sims H.V., Woods D.E. 1988. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study. J Infect Dis. 157(5):1054-1057.
- Palomino-Camargo C., González-Muñoz Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 31(3):535-546.
- Parck C.H., Kim H.J., Hixon D.L. 2002. Importance of testing stool specimens for Shiga toxins. J. Clin. Microbiol. 40:3542-3543.
- Parma A.E., Sanz M.E., Blanco J.E., Blanco J., Viñas M.R., Blanco M., Padola N.L., Etcheverría A.I. 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. Eur J Epidemiol. 16(8):757-762.
- Paton A.W., Paton J.C. 1998a. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11:450-479.
- 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.
- Paton A.W., Paton J.C. 1999. Direct detection of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 37:3362-3365.

- Paton A.W., Paton J.C. 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *J. Clin. Microbiol.* 40:271-274.
- Paton A.W., Paton J.C. 2005. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. *J Clin Microbiol.* 43(6):2944-2947.
- Paton, A.W.; Paton, J.C. 2010. *Escherichia coli* Subtilase Cytotoxin. *Toxins* 2, 215-228.
- Paton A.W., Ratcliff R.M., Doyle R.M., Seymour-Murray J., Davos D., Lanser J.A., Paton J.C. 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34:1622-1627.
- Paton A.W., Manning P.A., Woodrow M.C., Paton J.C. 1998. Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity. *Infect Immun.* 66(11):5580-5586.
- Paton A.W., Woodrow M.C., Doyle R.M., Lanser J.A., Paton J.C. 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 37(10):3357-3361.
- Paton A.W., Srimanote P., Woodrow M.C., Paton J.C. 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* 69:6999-7009.
- Paton A.W., Srimanote P., Talbot U.M., Wang H., Paton J.C. 2004. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 2004 Jul 5;200(1):35-46. Epub 2004 Jun 28. Erratum in: *J Exp Med.* 2004; 200(11):1525.
- Paunio M., Pebody R., Keskimäki M., Kokki M., Ruutu P., Oinonen S., Vuotani V., Siitonen A., Lahti E., Leinikki P. 1999. Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.* 122:1-5.
- Pearce M.C., Jenkins C., Vali L., Smith A.W., Knight H.I., Cheasty T., Smith H.R., Gunn G.J., Woolhouse M.E., Amyes S.G., Frankel G. 2004. Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1708-1716.
- Pearce M.C., Chase-Topping M.E., McKendrick I.J., Mellor D.J., Locking M.E., Allison L., Ternent H.E., Matthews L., Knight H.I., Smith A.W., Synge B.A., Reilly W., Low J.C., Reid S.W., Gunn G.J., Woolhouse M.E. 2009. Temporal and spatial patterns of bovine *Escherichia coli* O157 prevalence and comparison of temporal changes in the patterns of phage types associated with bovine shedding and human *E. coli* O157 cases in Scotland between 1998-2000 and 2002-2004. *BMC Microbiol.* 9:276.
- Pebody R.G., Furtado C., Rojas A., McCarthy N., Nylen G., Ruutu P., Leino T., Chalmers R., de Jong B., Donnelly M., Fisher I., Gilham C., Graverson L., Cheasty T., Willshaw G., Navarro M., Salmon R., Leinikki P., Wall P., Bartlett C. 1999. An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection among tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiol. Infect.* 123: 217-223.
- Pei Y., Terajima J., Saito Y., Suzuki R., Takai N., Izumiya H., Morita-Ishihara T., Ohnishi M., Miura M., Iyoda S., Mitobe J., Wang B., Watanabe H. 2008. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Jpn J Infect Dis.* 61(1):58-64.
- Pennington H. 1998. Factors involved in recent outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 in Scotland and recommendations for its control. *Journal of Food Safety*, 18(4):383-391.
- Pennington H. 2010. *Escherichia coli* O157. *Lancet.* 376(9750):1428-1435.
- Penteado A.S., Ugrinovich L.A., Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Andrade J.R., Corrêa S.S., Pestana de Castro A.F. 2002. Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *Vet Microbiol.* 89(1):41-51.
- Pereira M., Byrne B.A., Nguyen T.B., Lewis D.J., Atwill E.R. 2013. The occurrence of subtilase-cytotoxin-encoding genes in environmental *Escherichia coli* isolated from a Northern California estuary. *Can J Microbiol.* 59:437-441.
- Pérez L., Apezteguía L., Piñeyrua C., Dabiez A., Bianco M.N., Schelotto F., Varela G. 2014. Hemolytic uremic syndrome with mild renal involvement due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O145 strain. *Rev Argent Microbiol.* 46(2):103-106.
- Perna N.T., Mayhew G.F., Pósfai G., Elliott S., Donnenberg M.S., Kaper J.B., Blattner F.R. 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 66(8):3810-3817.
- Perry N., Cheasty T., Dallman T., Launders N., Willshaw G. 2013. Application of multilocus variable number tandem repeat analysis to monitor Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 phage type 8 in England and Wales: emergence of a profile associated with a national outbreak. *J Appl Microbiol.* (4):1052-1058.
- Persson S., Olsen K.E., Ethelberg S., Scheutz F. 2007. Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol.* 45(6):2020-2024.

- Peterson J.H., Tian P., Ieva R., Dautin N., Bernstein H.D. 2010. Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal segment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(41):17739-17744.
- Pichner R., Sander A., Steinrück H., Gareis M. 2005. Occurrence of *Salmonella* spp. And shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in horse faeces and horse meat products. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 118(7-8):321-325.
- Pièrard D., Stevens D., Moriau L., Lior H., Lauwers S. 1997a. Isolation and virulence factors of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 3:531-540.
- Pièrard D., Van Damme L., Moriau L., Stevens D., Lauwers S. 1997b. Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4585-4587.
- Pièrard D., Muyldermans G., Moriau L., Stevens D., Lauwers S. 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol.* 36(11):3317-3322.
- Pigatto C.P., Schocken-Iturrino R.P., Souza E.M., Pedrosa F.O., Comarella L., Irino K., Kato M.A., Farah S.M., Warth J.F., Fadel-Picheth C.M. 2008. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. *Can J Microbiol.* 54(7):588-593.
- Pinaka O., Pournaras S., Mouchtouri V., Plakokefalos E., Katsiaflaka A., Kolokythopoulou F., Barboutsi E., Bitsolas N., Hadjichristodoulou C. 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Central Greece: prevalence and virulence genes of O157:H7 and non-O157 in animal feces, vegetables, and humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32(11):1401-1408.
- Pollard D.R., Johnson W.M., Lior H., Tyler S.D., Rozée K.R. 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28:540-545.
- Pradel N., Livrelli V., De Champs C., Palcox J.B., Reynaud A., Scheutz F., Sirot J., Joly B., Forestier C. 2000. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* 38:1023-1031.
- Pradel N., Boukhors K., Bertin Y., Forestier C., Martin C., Livrelli V. 2001. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol.* 67(6):2460-2468.
- Pradel N., Bertin Y., Martin C., Livrelli V. 2008. Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl Environ Microbiol.* 74(7):2118-2128.
- Prager R., Liesegang A., Voigt W., Rabsch W., Fruth A., Tschäpe H. 2002. Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2/H(-) in Germany. *Infect Genet Evol.* 1(4):265-275.
- Prager R., Strutz U., Fruth A., Tschäpe H. 2003. Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus fliC polymorphisms. *Int J Med Microbiol.* 292(7-8):477-486.
- Prager R., Annemüller S., Tschäpe H. 2005. Diversity of the virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases- need for more detailed diagnostics. *Int. J. Med. Microbiol.* 295:29-38.
- Prager R., Fruth A., Busch U., Tietze E. 2011. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *Int J Med Microbiol.* 301:181-191.
- Prats G., Frías C., Margall N., Llovet T., Gaztelurrutia L., Elcuaz R., Canut A., Bartolomé R. M., Torroba L., Dorronsoro Y., Blanco J., Blanco M., Rabella N., Coll P., Mirellis B. 1996. Colitis hemorrágica por *Escherichia coli* verotoxigénica. Presentación de 9 casos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 14:7-15.
- Preston M.A., Johnson W., Khakhria R., Borczyk A. 2000. Epidemiologic subtyping of *Escherichia coli* serogroup O157 strains isolated in Ontario by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38:2366-2368.
- Preußel K., Höhle M., Stark K., Werber D. 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 is more likely to lead to hospitalization and death than non-O157 serogroups--except O104. *PLoS One.* 8(11):e78180.
- Pritchard G.C., Williamson S., Carson T., Bailey J.R., Warner L., Willshaw G., Cheasty T. 2001. Wild rabbits--a novel vector for verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet Rec.* 149(18):567.
- Pulz M., Matussek A., Monazahian M., Tittel A., Nikolic E., Hartmann M., Bellin T., Buer J., Gunzer F. 2003. Comparison of a Shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two types of PCR for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41:4671-4675.
- Puño-Sarmiento J., Medeiros L., Chiconi C., Martins F., Pelayo J., Rocha S., Blanco J., Blanco M., Zanutto M., Kobayashi R., Nakazato G. 2013. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Vet Microbiol.* 166(3-4):676-80.
- Raghubeer E.V., Ke J.S., Campbell M.L., Meyer R.S. 1995. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. *J. Food Prot.* 58:13-18.
- Ramachandran V., Hornitzky M.A., Bettelheim K.A., Walker M.J., Djordjevic S.P. 2001. The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the

- same serotypes possess a stx2d toxin type. *J. Clin. Microbiol.* 39:1932-1937.
- Ramonedá M., Foncuberta M., Simon M., Sabate S., Ferrer M.D., Herrera S., Landa B., Muste N., Martí R., Trabado V., Carbonell O., Vila M., Espelt M., Ramirez B., Duran J. 2013. Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 (VTEC O157) and compliance with microbiological safety standards in bovine carcasses from an industrial beef slaughter plant. *Letters in Applied Microbiology*, 56(6):408-413.
- Randall L.P., Wray C., McLaren I.M. 1997. Studies on the development and use of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of verotoxic *Escherichia coli* in animal faeces. *Vet Rec.* 140(5):112-115.
- Rangel J.M., Sparling P.H., Crowe C., Griffin P.M., Swerdlow D.L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infect. Dis.* 11:603-609.
- Rasko D.A., Rosovitz M.J., Myers G.S., Mongodin E.F., Fricke W.F., Gajer P., Crabtree J., Sebaihia M., Thomson N.R., Chaudhuri R., Henderson I.R., Sparandio R., y Ravel J. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology*, 190(20): 6881-6893.
- Rasko D.A., Webster D.R., Sahl J.W., Bashir A., Boisen N., Scheutz F., Paxinos E.E., Sebra R., Chin C.S., Iliopoulos D., Klammer A., Peluso P., Lee L., Kislyuk A.O., Bullard J., Kasarskis A., Wang S., Eid J., Rank D., Redman J.C., Steyert S.R., Frimodt-Møller J., Struve C., Petersen A.M., Krogfelt K.A., Nataro J.P., Schadt E.E., Waldor M.K. 2011. Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome in Germany. *N Engl J Med.* 365(8):709-717.
- Rasmussen M.A., Casey T.A. 2001. Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. *Critic. Rev. Microbiol.* 27:57-73.
- Rasmussen M.M., Opintan J.A., Frimodt-Møller N., Styrihave B. 2015. Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* Isolates in Imported and Locally Produced Chicken Meat from Ghana. *PLoS One.* 10(10):e0139706.
- Read S.C., Gyles C.L., Clarke R.C., Lior H., McEwen S. 1990. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario. *Epidemiol. Infect.* 105:11-20.
- Reid S.D., Herbelin C.J., Bumbaugh A.C., Selander R.K., Whittam T.S. 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406, 64-67.
- Reilly A. 1998. Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: Memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the World Health Organization* 76:245-255.
- Reinstein S., Fox J.T., Shi X., Alam M.J., Nagaraja T.G. 2007. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in the American bison (Bison bison). *J Food Prot.* 70(11):2555-2560.
- Renter D.G., Sargeant J.M., Hygnstorm S.E., Hoffman J.D., Gillespie J.R. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. *J Wildl Dis.* 37(4):755-760.
- Renter D.G., Morris J.G. Jr., Sargeant J.M., Hungerford L.L., Berezowski J., Ngo T., Williams K., Acheson D.W. 2005. Prevalence, risk factors, O serogroups, and virulence profiles of Shiga toxin-producing bacteria from cattle production environments. *J Food Prot.* 68(8):1556-1565.
- Rey J., Blanco J.E., Blanco M., Mora A., Dahbi G., Alonso J.M., Hermoso M., Hermoso J., Alonso M.P., Usera M.A., González E.A., Bernárdez M.L., Blanco J. 2003. Serotypes, phage types and virulence genes of shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Vet Microbiol.* 294(1):47-56.
- Rey J., Sanchez S., Blanco J.E., Hermoso de Mendoza J., Hermoso de Mendoza M., Garcia A., Gil C., Tejero N., Rubio R., Alonso J.M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int J Food Microbiol.* 107:212-217.
- Rice D.H., Hancock D.D., Besser T.E. 1995. Verotoxigenic *E. coli* O157 colonisation of wild deer and range cattle. *Vet Rec.* 137(20):524.
- Rice D.H., McMenamin K.M., Pritchett L.C., Hancock D.D., Besser T.E. 1999. Genetic subtyping of *Escherichia coli* O157 isolates from 41 Pacific Northwest USA cattle farms. *Epidemiol. Infect.* 122(3):479-484.
- Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Hebert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.
- Rios M., Prado V., Trucksis M., Arellano C., Borie C., Alexandre M., Fica A., Levine M.M. 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J Clin Microbiol.* 37(3):778-781.
- Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, García B, Fiorilli G, Sosa-Estani S, Kincaid J, Rangel J, Griffin PM; Case-Control Study Group. 2006a. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis.* 3(1):88-96.
- Rivero M.A., Passucci J.A., Rodríguez E.M., Parma A.E. 2010. Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. *J Med Microbiol.* 59(Pt 3):345-352.

- Robert Koch Institute (RKI) EHEC/HUS O104:H4 The outbreak is considered to be over. (http://www.rki.de/cln_117/nn_217400/EN/Home/PM_EHEC.html).
- Robins-Browne R.M., Hartland E.L. 2002. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. J. Gastroenterol. Hepatol. 17:467-475.
- Robins-Browne R.M., Bordun A.M., Tauschek M., Bennett-Wood V.R., Russell J., Oppedisano F., Lister N.A., Bettelheim K.A., Fairley C.K., Sinclair M.I., Hellard M.E. 2004. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. Emerg Infect Dis. 10(10):1797-1805.
- Robins-Browne R.M., Holt K.E., Ingle D.J., Hocking D.M., Yang J., Tauschek M. 2016. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? Front Cell Infect Microbiol. 6:141. eCollection 2016. Review.
- Rohde H., Qin J., Cui Y., Li D., Loman N.J., Hentschke M., Chen W., Pu F., Peng Y., Li J., Xi F., Li S., Li Y., Zhang Z., Yang X., Zhao M., Wang P., Guan Y., Cen Z., Zhao X., Christner M., Kobbe R., Loos S., Oh J., Yang L., Danchin A., Gao G.F., Song Y., Li Y., Yang H., Wang J., Xu J., Pallen M.J., Wang J., Aepfelbacher M., Yang R. 2011. Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. N. Engl. J. Med. 365: 718-724.
- Román, A. 2002. Calidad higiénico sanitaria de la carne de vacuno. Detección de *Escherichia coli* verotoxigénico O157:H7. Universidad de Santiago de Compostela.
- Rounds J.M., Rigdon C.E., Muhl L.J., Forstner M., Danzeisen G.T., Koziol B.S., Taylor C., Shaw B.T., Short G.L., Smith K.E. 2012. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated with venison. Emerg Infect Dis. 18(2):279-282.
- Rúgeles L.C., Bai J., Martínez A.J., Vanegas M.C., Gómez-Duarte O.G. 2010. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. Int J Food Microbiol. 138(3):282-286.
- Rump L.V., Bodeis-Jones S., Abbott J., Zhao S., Kase J., Lorenz S., Fischer M., Brown E., Meng J. 2012. Genetic characterization of *Escherichia coli* O104 isolates from different sources in the United States. Appl Environ Microbiol. 78(5):1615-1618.
- Rump L.V., Gonzalez-Escalona N., Ju W., Wang F., Cao G., Meng S., Meng J. 2015. Genomic diversity and virulence profiles of historical *Escherichia coli* O157 strains isolated from clinical and environmental sources. Appl Environ Microbiol. 81(2):569-577.
- Russo T., Johnson J.R. 2000. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. The Journal of Infectious Diseases. 181:1753-1754.
- Saari M., Cheasty T., Leino K., & Siitonen A. 2001. Phage types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Finland. J. Clin. Microbiol. 39: 1140-1143.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230(4732):1350-1354.
- Saitoh T., Iyoda S., Yamamoto S., Lu Y., Shimuta K., Ohnishi M., Terajima J., Watanabe H. 2008. Transcription of the ehx enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Bacteriol. 190(14):4822-4830.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.
- Sakai T., Sawai T., Shimizu Y., Morimune T., Okuda Y., Maruo Y., Iyoda S., Takeuchi Y. 2015. *Escherichia coli* O121:H19 infection identified on microagglutination assay and PCR. Pediatr Int. 57(5):1001-1003.
- Salmon R. 2005. Outbreak of verotoxin producing *E. coli* O157 infections involving over forty schools in south Wales, September 2005. Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles. European Communicable Disease Bulletin, 10(10):E051006.1.
- Samadpour M., Ongerth J.E., Liston J., Tran N., Nguyen D., Whittam T.S., Wilson R.A., Tarr P.I. 1994. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1038-1040.
- Sancak A.A., Rutgers H.C., Hart C.A., Batt R.M. 2004. Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. Vet Rec. 154(4):101-106.
- Sánchez S., García-Sánchez A., Martínez R., Blanco J., Blanco J.E., Blanco M., Dahbi G., Mora A., Hermoso de Mendoza J., Alonso J.M., Rey J. 2009a. Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants. Vet J. 180(3):384-388.
- Sánchez S., Martínez R., García A., Blanco J., Blanco J.E., Blanco M., Dahbi G., López C., Mora A., Rey J., Alonso J.M. 2009b. Longitudinal study of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding in sheep feces: persistence of specific clones in sheep flocks. Appl Environ Microbiol. 75(6):1769-1773.
- Sánchez S., Martínez R., García A., Vidal D., Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Herrera-León S., Echeita A., Alonso J.M., Rey J. 2010a. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. Vet Microbiol. 143(2-4):420-423.
- Sánchez S., Martínez R., Rey J., García A., Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Herrera-León S., Echeita A., Alonso J.M. 2010b. Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. Vet. Microbiol. 142(3-4):445-449.

- Sánchez S., Martínez R., García A., Blanco J., Echeita A., Hermoso de Mendoza J., Rey J., Alonso J.M. 2010c. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from extensive cattle of the fighting bulls breed. *Res Vet Sci.* 88(2):208-210.
- Sánchez S., Martínez R., Alonso J.M., Rey J. 2010d. Clinical and pathogenic aspects of infections due to *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxigenic *E. coli*. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 28(6):370-374.
- Sánchez S., Beristain X., Martínez R., García A., Martín C., Vidal D., Díaz-Sánchez S., Rey J., Alonso J.M., Herrera-León S. 2012. Subtilase cytotoxin encoding genes are present in human, sheep and deer intimin-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O128:H2. *Vet Microbiol.* 159(3-4):531-535.
- Sánchez S., Díaz-Sánchez S., Martínez R., Llorente M.T., Herrera-León S., Vidal D. 2013. The new allelic variant of the subtilase cytotoxin (*subAB2*) is common among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from large game animals and their meat and meat products. *Vet Microbiol.* 166(3-4):645-649.
- Sánchez S., Cenoz M.G., Martín C., Beristain X., Llorente M.T., Herrera-León S. 2014. Cluster investigation of mixed O76:H19 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* infection in a Spanish household. *Epidemiol Infect.* 142(5):1029-1033.
- Sandhu K.S., Gyles C.L. 2002. Pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the intestine of calves. *Can J Vet Res.* 66(2):65-72.
- Sandhu K.S., Clarke R.C., McFadden K., Brouwer A., Louie M., Wilson J., Lior H., Gyles C.L. 1996. Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. *Epidemiol Infect.* 116(1):1-7.
- Sandhu K.S., Clarke R.C., and Gyles C.L. 1997. Hemolysin phenotypes and genotype of *eaeA*-positive and *eaeA*-negative bovine verotoxigenic *Escherichia coli*. In P. S. Paul, D. H. Francis, and D. A. Benfield (ed.), *Mechanisms in the pathogenesis of enteric disease*. Plenum Press, New York, NY.
- Sanz M.E., Vinas M.R., Parma A.E. 1998. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *European Journal of Epidemiology*, 14(4):399-403.
- Sargeant J.M., Hafer D.J., Gillespie J.R., Oberst R.D., Flood S.J. 1999. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer sharing rangeland with cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 215(6):792-794.
- Sartz L., De Jong B., Hjertqvist M., Plym-Forshell L., Alsterlund R., Löfdahl S., Osterman B., Ståhl A., Eriksson E., Hansson HB., Karpman D. 2008. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiol Infect.* 136(3):370-380.
- Sasaki Y., Usui M., Murakami M., Haruna M., Kojima A., Asai T., Yamada Y. 2012. Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 isolates from beef cattle. *Jpn J Infect Dis.* 65(2):117-121.
- Savageau M.A. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *American Naturalist*, 732-744.
- Scaife H.R., Cowan D., Finney J., Kinghorn-Perry S.F., Crook B. 2006. Wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as potential carriers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet Rec.* 159(6):175-178.
- Scaletsky I.C., Fabbrocetti S.H., Silva S.O., Morais M.B., Fagundes-Neto U. 2002. HEP-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 8:855-858.
- Scaletsky I.C., Michalski J., Torres A.G., Dulguer M.V., Kaper J.B. 2005. Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 73:4753-4765.
- Scaletsky I.C., Aranda K.R., Souza T.B., Silva N.P., Morais, M.B. 2009. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11):3756-3759.
- Scavia G., Morabito S., Tozzoli R., Michelacci V., Marziano M.L., Minelli F., Ferreri C., Paglialonga F., Edefonti A., Caprioli A. 2011. Similarity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strains from Italy and Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 17(10):1957-1958.
- Scheutz F., Beutin L., Smith H.R. 2000. Characterisation of non O157 Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) isolated from patients with haemolytic uraemic syndrome (HUS) world-wide from 1982 to 2000. 4th International Symposium and Workshop on "Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections". October 29-November 2. Kyoto, Japan.
- Scheutz F., Olesen B., Engberg J., Petersen A.M., Molbak K., Schiellerup P., Smidt P.G. 2001. Clinical features and epidemiology of infections by Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) from Danish patients 1997-2000, and characterisation of VTEC isolates by serotypes and virulence factors. En: *Verocytotoxigenic E. coli in Europe*, 5. Epidemiology of Verocytotoxigenic *E. coli*. Concerted Action CT98-3935. Eds. Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., & McDowell D.A. Teagasc, The National Food Centre, Dublin. :58-66.
- Scheutz F., Nielsen E.M., Frimodt-Moller J., Boisen N., Morabito S., Tozzoli R., Nataro J.P., Caprioli A. 2011. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill.* 16(24). pii:19889.

- Scheutz F., Teel L.D., Beutin L., Piérard D., Buvens G., Karch H., Mellmann A., Caprioli A., Tozzoli R., Morabito S., Strockbine N.A., Melton-Celsa A.R., Sanchez M., Persson S., O'Brien A.D. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol.* 50(9):2951-2963.
- Schimmer B., Eriksen H.M., Nygård K., Grahek-Ogden D., Madssen T., Hajdu A., Løvoll Ø., Stavnes T.L., Lassen J., Kapperud G., Aavitsland P. 2006. An outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with minced beef, Norway, January-February 2006: preliminary report. *Euro Surveill.* 11(3):E060302.1.
- Schimmer B., Nygard K., Eriksen H.M., Lassen J., Lindstedt B.A., Brandal L.T., Kapperud G., Aavitsland P. 2008. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infect Dis.* 8:41.
- Schmidt H. 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* 152:687-695.
- Schmidt H., and Karch H. 1996. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 34:2364-2367.
- Schmidt H., Karch H., Beutin L. 1994. The large-sized plasmids of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode haemolysins which are presumably members of the *E. coli* α -haemolysin family. *FEMS Microbiol. Lett.* 117:189-196.
- Schmidt H., Beutin L., Karch H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63:1055-1061.
- Schmidt H., Henkel B., Karch H. 1997. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of Gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett.* 148:265-272.
- Schmidt H., Geitz C., Tarr I.P., Frosch M., Karch H. 1999a. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J. Infect. Dis.* 179:115-123.
- Schmidt H., Scheef J., Huppertz H. I., Frosch M., Karch H. 1999b. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H- strains that do not produce Shiga toxins: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 37:3491-3496.
- Schmidt H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L.H., Karch H. 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol.* 66(3):1205-1208.
- Schmidt H., Bitzan M., Karch H. 2001. Pathogenic aspects of STEC infections in humans. En: Verocytotoxigenic *E. coli*. Eds. Duffy G., Garvey P., & McDowell A. Food and Nutrition Press. USA: 241-262.
- Schmidt M.A. 2010. LEE ways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell. Microbiol.* 12:1544-1552.
- Schoonderwoerd, M., R. C. Clarke, A. A. van Dreumel, and S. A. Rawluk. 1988. Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of *Escherichia coli* O111:NM. *Can. J. Vet. Res.* 52:484-487.
- Schouten J.M., Van de Giessen A.W., Frankena K., De Jong M.C.M., Graat, E.A.M. 2005. *Escherichia coli* O157 prevalence in Dutch poultry, pig finishing and veal herds and risk factors in Dutch veal herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 70(1-2):1-15.
- Schultsz C., Pool G.J., van Ketel R., de Wever B., Speelman P., Dankert J. 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J Clin Microbiol.* 32(10):2393-2397.
- Scotland S.M., Smith H.R. 1997. Verocytotoxins. En *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. Ed. Sussuman M. Cambridge University Press, R.U. :257-280.
- Scotland SM, Rowe B, Smith HR, Willshaw GA, Gross RJ. 1988. Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. *J Med Microbiol.* 25(4):237-243.
- Sekla L., Milley D., Stackiw W. 1990. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in ground beef in Manitoba. *Can. Med. Assoc. J.* 143:519-521.
- Sekse C., Solberg A., Petersen A., Rudi K., Wasteson Y. 2005. Detection and quantification of Shiga toxin-encoding genes in sheep faeces by real-time PCR. *Mol Cell Probes.* 19(5):363-370.
- Sekse C., O'Sullivan K., Granum P.E., Rørvik L.M., Wasteson Y., Jørgensen H.J. 2009. An outbreak of *Escherichia coli* O103:H25 - bacteriological investigations and genotyping of isolates from food. *Int J Food Microbiol.* 133(3):259-264.
- Selander R.K., Levin B.R. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* 210:545 547.
- Seto K, Taguchi M, Kobayashi K, Kozaki S. 2007. Biochemical and molecular characterization of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka prefecture. *J Vet Med Sci.* 69(12):1215-1222.
- Shaw D.J., Jenkins C., Pearce M.C., Cheasty T., Gunn G.J., Dougan G., Smith H.R., Woolhouse M.E.J., Frankel G. 2004. Shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a Scottish beef farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7456-7465.

- Shen S., Mascarenhas M., Morgan R., Rahn K., Karmali M.A. 2005. Identification of Four Fimbria-Encoding Genomic Islands That Are Highly Specific for Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Serotype O157 Strains. *J. Clin. Microbiol.* 43:3840-3850.
- Shen J., Rump L., Ju W., Shao J., Zhao S., Brown E., Meng J. 2015. Virulence characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from food, humans and animals. *Food Microbiol.* 50:20-27.
- Sheng H., Davis M.A., Knecht H.J., Hancock D.D., Van Donkersgoed J., Hovde C.J. 2005. Characterization of a Shiga toxin-, intimin-, and enterotoxin hemolysin-producing *Escherichia coli* O157:H25 strain commonly isolated from healthy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 43:3213-3220.
- Sheridan J.J., McDowell D.A. 1998. Factors affecting the emergence of pathogens on foods. *Meat Science* 49:151-167.
- Sherwood D., Snodgrass D.R., O'Brien A.D. 1985. Shiga-like toxin production from *Escherichia coli* associated with calf diarrhoea. *Vet Rec.* 116(8):217-218.
- Shridhar P.B., Siepker C., Noll L.W., Shi X., Nagaraja T.G., Bai J. 2017. Shiga Toxin Subtypes of Non-O157 *Escherichia coli* Serogroups Isolated from Cattle Feces. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:121.
- Simms I., Gilbert V.L., Byrne L., Jenkins C., Adak G.K., Hughes G., Crook P.D. 2014. Identification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O117:H7 in men who have sex with men, England, November 2013 to August 2014. *Euro Surveill.* 19(43).
- Singer R.S., Sischo W.M., Carpenter T.E. 2004. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 42:5502-5511.
- Skinner C., Patfield S., Stanker L., He X. 2013. Development of monoclonal antibodies and immunoassays for sensitive and specific detection of Shiga toxin Stx2f. *PLoS One.* 8(9):e76563.
- Slanec T, Fruth A, Creuzburg K, Schmidt H. 2009. Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 75(19):6187-6197.
- Slutsker L., Ries A.A., Greene K.D., Wells J.G., Hutwagner L., Griffin P.M. 1997. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* 126:505-513.
- Smith D., Willshaw G., Stanley J., Arnold C. 2000. Genotyping of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: comparison of isolates of a prevalent phage type by fluorescent amplified-fragment length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *J Clin Microbiol.* 38(12):4616-4620.
- Smith H.R., Rowe B., Gross R.J., Fry N.K., Scotland S.M. 1987. Haemorrhagic colitis and Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* in England and Wales. *Lancet.* 1(8541):1062-1065.
- Smith H.R., Cheasty T., Roberts D., Thomas A., Rowe B. 1991. Examination of retail chickens and sausages in Britain for vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 57(7):2091-2093.
- Smith J.L., Fratamico P.M., Gunther N.W. IV. 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol.* 86:145-197.
- Smith J.M., Feil E.J., Smith N.H. 2000. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *BioEssays.* 22:1115-1122.
- Soborg B., Lassen S.G., Müller L., Jensen T., Ethelberg S., Mølbak K., Scheutz F. 2013. A verocytotoxin-producing *E. coli* outbreak with a surprisingly high risk of haemolytic uraemic syndrome, Denmark, September-October 2012. *Euro Surveill.* 18(2).
- Söderström A., Lindberg A., Andersson Y. 2005. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Euro Surveill.* 10(9):E050922.1.
- Söderström A., Osterberg P., Lindqvist A., Jönsson B., Lindberg A., Blide Ulander S., Welinder-Olsson C., Löfdahl S., Kaijser B., De Jong B., Kühlmann-Berenzon S., Boqvist S., Eriksson E., Szanto E., Andersson S., Allestam G., Hedenström I., Ledet Muller L., Andersson Y. 2008. A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. *Foodborne Pathog Dis.* 5(3):339-349.
- Soler Crespo P., Pezzi G.H., & de Mateo Ontañón S. 1999. Vigilancia de *Escherichia coli* O157 en España. *Boletín Epidemiológico Semanal: Vigilancia Epidemiológica,* 7(10): 105-106.
- Sonntag, A.K., Prager R., Bielaszewska M., Zhang W., Fruth A., Tschäpe H. Karch H. 2004. Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 42:954-962.
- Sonoda C., Tagami A., Nagatomo D., Yamada S., Fuchiwaki R., Haruyama M., Nakamura Y., Kawano K., Okada M., Shioyama Y., Iryoda K., Wakamatu H., Hidaka Y. 2008. An enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak at a nursery school in Miyazaki, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 61(1):92-93.
- Sparbier K., Lange C., Jung J., Wieser A., Shubert S., Kostrzewa M. 2013. Biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3741-3748.
- Spratt B.G., Hanage W.P., Li B., Aanensen D.M., Feil E.J. 2004. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett.* 241(2):129-134.
- Srimanote P., Paton A.W., Paton J.C. 2002. Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia*

- coli strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* 70(6):3094-3100.
- Starr M., Bennett-Wood V., Bigham A.K., de Koning-Ward T.F., Bordun A.M., Lightfoot D., Bettelheim K.A., Jones C.L., Robins-Browne R.M. 1998. Hemolytic-uremic syndrome following urinary tract infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli*: case report and review. *Clin Infect Dis.* 27(2):310-315. Review.
- Steele B.T., Murphy N. Rance C.P. 1982. An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J. Pediatr.* 101:963-965.
- Steele M.L., McNab W.B., Poppe C., Graffiths M.W., Chen S., Degrandis S.A., Fruhner L.C., Larkin C.A., Lynch J.A., Odumeru J.A. 1997. Survey of Ontario bulk tank milk for food borne pathogens. *J. Food Prot.*, 60: 1341-1346.
- Stephan R., Untermann F. 1999. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J Clin Microbiol.* 37(5):1570-1572.
- Stephan R., Schumacher S., Corti S., Krause G., Danuser J., Beutin L. 2008. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *J Dairy Sci.* 91(7):2561-2565.
- Stewart C.S., Flint H.J. (Eds.) 1999. *Escherichia coli* O157 in farm animals. CABI Publishing, Wallingford, UK. 256pp. (<http://www.jsava.co.za/index.php/jsava/article/viewFile/682/656>).
- Steyert S.R., Sahl J.W., Fraser C.M., Teel L.D., Scheutz F., Rasko D.A. 2012. Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2:133.
- Stritt A., Tschumi S., Kottanattu L., Bucher B.S., Steinmann M., von Steiger N., Stephan R., Hächler H., Simonetti G.D. 2013. Neonatal Hemolytic Uremic Syndrome After Mother-to-Child Transmission of a Low-Pathogenic stx2b Harboring Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis.* 56(1):114-116.
- Strockbine N.A., Jackson M.P., Sung L.M., Holmes R.K., O'Brien A.D. 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Bacteriol.* 170:1116-1122.
- Strockbine N.A., Wells J.G.B., Bopp L.A., Barrett T.J. 1998. Overview of detection and subtyping methods. En: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Eds. Kaper J.B. & O'Brien A.D. ASM, Washington DC.:331-356.
- Struelens J., y Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (MESGEM). 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiology and Infect.* 2 (1): 2-11.
- Struelens M., De Ryck R., Deplano A. 2001. Analysis of Microbial Genomic Macrorestriction Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Typing. New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data. 159-176. 10.1016/B978-044450740-2/50008-3.
- Swerdlow D.L., Woodruff B.A., Brady R.C., Griffin P.M., Tippen S., Donnell H.D., Geldreich E., Payne B.J., Meyer A., Wells J.G., Greene K.D., Bright M., Bean N.H. Blake P.A. 1992. A waterborne outbreak in missouri of *Escherichia coli* O157-H7 associated with bloody diarrhea and death. *Annals of Internal Medicine.* 117(10):812-819.
- Syngé B.A. 1999. Methods used for isolation and typing of *E. coli* isolates from livestock in Scotland. En: Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe, 1. Methods for verocytotoxigenic *E. coli*. Concerted Action CT98-3935. Eds. Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., & McDowell D.A. Teagasc, The National Food Centre, Dublin.:100-105.
- Takeda Y., Kurazono H., Yamasaki S. 1993. Vero toxins (Shiga-like toxins) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (verocytotoxin-producing *E. coli*). *MicrobiolImmunol.* 37(8):591-599. Review.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tanaka H., Ohseto M., Yamashita Y., , Shinohara N., Inoue H., Sasaki Y., Kakihara Y., Tsukamoto T., Yutsudo T., Oku Y., et al. 1989. Bacteriological investigation on an outbreak of acute enteritis associated with verotoxin-producing *Escherichia coli* O111:H-. *Kansenshogaku Zasshi.* 63:1187-1194.
- Tarr C.L., Whittam T.S. 2002. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 184(2):479-487.
- Tarr C.L., Large T.M., Moeller C.L., Lacher D.W., Tarr P.I., Acheson D.W., Whittam T.S. 2002. Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 70(12):6853-6859.
- Tarr P.I., Fouser L.S., Stapleton A.E., Wilson R.A., Kim H.H., Vary J.C., Clausen C.R. 1996. Hemolytic-uremic syndrome in a 6-year-old girl after an urinary tract infection with Shiga-toxin-producing *E. coli* O103:H2. *N Engl J Med.* 335(9):635-638.
- Tarr P.I., Besser T.E., Hancock D.D., Keene W.E., Goldoft M. 1997. Verotoxigenic *Escherichia coli* infection: U.S. overview. *J. Food. Prot.* 60:1466-1471.
- Tarr P.I., Tran N.T., Wilson R.A. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. *J Food Prot.* 62(2):133-139.
- Tarr P.I., Gordon C.A., Chandler W.L. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 365: 1073-1086.

- Tasara T., Fierz L., Klumpp J., Schmidt H., Stephan R. 2017. Draft Genome Sequences of Five Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Harboring the New and Recently Described Subtilase Cytotoxin Allelic Variant subAB2-3. *Genome Announc.* 5(8). pii: e01582-16.
- Tatsuno I., Horie M., Abe H., Miki T., Makino K., Shinagawa H., Taguchi H., Kamiya S., Hayashi T. 2001. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun.* 69:6660-6669.
- Tauxe RV. 2006. Molecular subtyping and the transformation of public health. *Foodborne Pathog Dis* 3:4-8.
- Taylor D.E., Rooker M., Keelan M., Ng L.K., Martin I., Perna N.T., Burland N.T., Blattner FR. 2002. Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Bacteriol.* 184(17):4690-4698.
- Taylor E.V., Nguyen T.A., Machesky K.D., Koch E., Sotir M.J., Bohm S.R., Folster J.P., Bokanyi R., Kupper A., Bidol S.A., Emanuel A., Arends K.D., Johnson S.A., Dunn J., Stroika S., Patel M.K., Williams I. 2013. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O145 infections associated with romaine lettuce consumption, 2010. *J Food Prot.* 76(6):939-944.
- Taylor J., Charter R.E. 1955. *Escherichia coli* O128 causing gastroenteritis of infants. *J Clin Pathol.* 8:276-281.
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., y Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3): 207-217.
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33(9):2233-2239. Review.
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol.* 18(6):426-439. Review.
- Terajima J., Izumiya H., Iyoda S., Mitobe J., Miura M., Watanabe H. 2006. Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* 3(1):68-73.
- Thomson-Carter F. 2001. General recovery, characterisation and typing protocols for VTEC. En: *Verocytotoxigenic E. coli*. Eds. Duffy G., Garvey P., & McDowell A. Food and Nutrition Press. USA: 91-112.
- Tobe T., Hayashi T., Han C.G., Schoolnik G.K., Ohtsubo E., Sasakawa C. 1999. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infection and Immunity*, 67(10):5455-5462.
- Toma C., Martínez Espinosa E., Song T., Miliwebsky E., Chinen I., Iyoda S., Iwanaga M., Rivas M. 2004. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 42:4937-4946.
- Toma C., Nakasone N., Miliwebsky E., Higa N., Rivas M., Suzuki T. 2008. Differential adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring *saa* to epithelial cells. *Int J Med Microbiol.* 298:571-578.
- Torres A.G., Girón J.A., Perna N.T., Burland V., Blattner F.R., Avelino-Flores F., Kaper J.B. 2002. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 70:5416-5427.
- Torres A.G., Vázquez-Juárez R.C., Tutt C.B., García-Gallegos J.G. 2005a. Pathoadaptative mutation that mediates adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111. *Infect. Immun.* 73:4766-4776.
- Torres A.G., Zhou X., Kaper J.B. 2005b. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect. Immun.* 73:18-29.
- Tostes R., Goji N., Amoako K., Chui L., Kastelic J., DeVinney R., Stanford K., Reuter T. 2017. Subtyping *Escherichia coli* Virulence Genes Isolated from Feces of Beef Cattle and Clinical Cases in Alberta. *Foodborne Pathog Dis.* 14(1):35-42.
- Tóth I., Schmidt H., Kardos G., Lancz Z., Creuzburg K., Damjanova I., Pászti J., Beutin L., Nagy B. 2009. Virulence genes and molecular typing of different groups of *Escherichia coli* O157 strains in cattle. *Appl Environ Microbiol.* 75(19):6282-6291.
- Touchon M., Hoede C., Tenaillon O., Barbe V., Baeriswyl S., Bidet P., Bingen E., Bonacorsi S., Bouchier C., Bouvet O., Calteau A., Chiapello H., Clermont O., Cruveiller S., Danchin A., Diard M., Dossat C., Karoui M.E., Frapy E., Garry L., Ghigo J.M., Gilles A.M., Johnson J., Le Bouguéne C., Lescat M., Manganot S., Martinez-Jéhanne V., Matic I., Nassif X., Oztas S., Petit M.A., Pichon C., Rouy Z., Ruf C.S., Schneider D., Tourret J., Vacherie B., Vallenet D., Médigue C., Rocha E.P., Denamur E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet*, 5(1): e1000344.
- Tourret J., Denamur E. 2016. Population Phylogenomics of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 4
- Tozzi A.E., Gorietti S., Caprioli. 2001. Epidemiology of human infections by *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli*. En: *Verocytotoxigenic E. coli*. Eds. Duffy G., Garvey P., & McDowell A. Food and Nutrition Press. USA. 161-180.

- Tozzi A.E., Caprioli A., Minelli F., Gianviti A., De Petris L., Edefonti A., Montini G., Ferretti A., De Palo T., Gaido M., Rizzoni G. 2003. Hemolytic Uremic Syndrome Study Group. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg Infect Dis.* 9(1):106-108.
- Tozzoli R., Caprioli A., Cappannella S., Michelacci V., Marziano M.L., Morabito S. 2010. Production of the subtilase AB5 cytotoxin by Shiga toxin-negative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 48:178-183.
- Trabulsi L.R., Keller R., Tardelli Gomes T.A. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 8(5):508-513. Review.
- Trees E., Strockbine N., Changayil S., Ranganathan S., Zhao K., Weil R., MacCannell D., Sabol A., Schmidtke A., Martin H., Stripling D., Ribot E.M., Gerner-Smidt P. 2014. Genome Sequences of 228 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates and 12 Isolates Representing Other Diarrheagenic *E. coli* Pathotypes. *Genome Announc.* 2(4). pii:e00718-14.
- Trevena W.B., Willshaw G.A., Cheasty T., Wray C., Gallagher J. 1996. Vero cytotoxin-producing *E. coli* O157 infection associated with farms. *Lancet.* 347(8993):60-61.
- Trotz-Williams L.A., Mercer N.J., Walters J.M., Maki A.M., Johnson R.P. 2012. Pork implicated in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Ontario, Canada. *Can J Public Health.* 103(5):e322-326.
- Tsai T.Y., Luo W.C., Wu F.T., Pan T.M. 2005. Molecular subtyping for *Escherichia coli* O157: H7 isolated in Taiwan. *Microbiol Immunol.* 49(7):579-588.
- Turrientes M.C., González-Alba J.M., del Campo R., Baquero M.R., Cantón R., Baquero F., Galán J.C. 2014. Recombination blurs phylogenetic groups routine assignment in *Escherichia coli*: setting the record straight. *PLoS One.* 9(8):e105395. Erratum in: *PLoS One.* 2014;9(11):e113532.
- Tuttle J., Gómez T., Doyle M.P., Wells J.G., Zhao T., Tauxe R.V., Griffin, P.M. 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology and Infection,* 122(2):185-192.
- Tzipori S., Wachsmuth I.K., Smithers J., Jackson C. 1988. Studies on gnotobiotic piglets on non-O157:H7 *Escherichia coli* serotypes isolated from patients with hemorrhagic colitis. *Gastroenterology* 94:590-597.
- Underwood A.P., Dallman T., Thomson N.R., Williams M., Harker K., Perry N., Adak B., Willshaw G., Cheasty T., Green J., Dougan G., Parkhill J., Wain J. 2013. Public health value of next-generation DNA sequencing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates from an outbreak. *J Clin Microbiol.* 51(1):232-237.
- UNICEF/OMS, United Nations International Children's Emergency Fund/Organizacion Mundial de la Salud. 2009. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done: 68. (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44174/1/9789241598415_eng.pdf).
- Unkmeir A., Schmidt H. 2000. Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect. Immun.* 68:4856-4864.
- Upton P., Coia J.E. 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurized milk supply. *Lancet,* 344(8928): 1015-1015.
- Urdahl A.M., Beutin L., Skjerve E., Wasteson Y. 2002. Serotypes and virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy Norwegian sheep. *J. Appl. Microbiol.* 93:1026-1033.
- Urdahl A.M., Beutin L., Skjerve E., Zimmermann S., Wasteson Y. 2003. Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. *J. Appl. Microbiol.* 95(1):92-101.
- USDA, United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. <http://www.ars.usda.gov/is/graphics/photos/mar05/K11077-1.htm>.
- USDA, United States Department of Agriculture. 2014. Microbiology laboratory guidebook 5B.03. Detection and isolation of nonO157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products. 2014. Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/MLG-5B.pdf?MOD=AJPERES>.
- Valat C, Haenni M, Saras E, Auvray F, Forest K, Oswald E, Madec JY. 2012. CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate of serotype O111:H8. *Appl Environ Microbiol.* 78(4):1308-1309.
- Valat C., Goldstone R.J., Hirchaud E., Haenni M., Smith D.G., Madec J.Y. 2016. Draft Genome Sequences of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Encoding Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Genome Announc.* 4(1). pii: e01633-15.
- Valcour J.E., Michel P., McEwen S.A., Wilson J.B. 2002. Associations between indicators of livestock farming intensity and incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Emerging Infectious Diseases,* 8(3):252-257.
- Vali L., Pearce M.C., Wisely K.A., Hamouda A., Knight H.I., Smith A.W., Amyes S.G.B. 2005. Comparison of spring-born beef calves at pasture and in housing. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1648-1652.
- Vally H., Hall G., Dyda A., Raupach J., Knope K., Combs B., Desmarchelier P. 2012. Epidemiology of Shiga toxin producing

- Escherichia coli* in Australia, 2000-2010. BMC Public Health 12:63.
- Van Duynhoven Y.T., De Jager C.M., Heuvelink A.E., Van Der Zwaluw W.K., Maas H.M., Van Pelt W., Wannet W.J. 2002. Enhanced laboratory-based surveillance of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O157 in The Netherlands. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 21(7):513-522.
- Vaz T.M., Irino K., Kato M.A., Dias A.M., Gomes T.A., Medeiros M.L., Rocha M.M., Guth B.E. 2004. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. J Clin Microbiol. 42(2):903-905.
- Verma A., Bolton F.J., Fiefield D., Lamb P., Woloschin E., Smith N., McCann R. 2007. An outbreak of *E. coli* O157 associated with a swimming pool: an unusual vehicle of transmission. Epidemiol Infect. 135(6):989-992. Erratum in: Epidemiol Infect. 2008 Feb;136(2):287.
- Vettorato M.P., Leomil L., Guth B.E., Irino K., 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(1-2):103-109.
- Vettorato M.P., de Castro A.F., Cergole-Novella M.C., Camargo F.L., Irino K., Guth B.E. 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(1):53-59.
- Vidal J.E., Canizalez-Roman A., Gutiérrez-Jimenez J., Navarro-García F. 2007. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. Salud Pública Mex. 49:376-386.
- Vieira M.A., Andrade J.R., Trabulsi L.R., Rosa A.C., Dias A.M., Ramos S.R., Frankel G., Gomes T.A. 2001. Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Escherichia coli* Strains of Non-Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Serogroups that Carry *eae* and Lack the EPEC Adherence Factor and Shiga Toxin DNA Probe Sequences. Journal of Infectious Diseases, 183(5):762-772.
- Viljanen M.K., Peltola T., Junnila S.Y., Olkkonen L., Järvinen H., Kuistila M., Huovinen P. 1990. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. Lancet. 336(8719):831-834.
- Vogt R.L., Dippold L. 2005. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002. Public Health Rep. 120(2):174-178.
- Vojdani J.D., Beuchat L.R., Tauxe R.V. 2008. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. Journal of Food Protection, 71(2):356-364.
- Vu-Khac H., Cornick N.A. 2008. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. Vet Microbiol. 126(4):356-363. Erratum in: Vet Microbiol. 2008 Sep 18;131(1-2):212-213.
- Vu-Khac H., Holoda E., Pilipcinec E., Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., Mora A., López C., González E.A., Blanco J. 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. Vet. J. 174:176-187.
- Wade W.G., Thom B.T., Evans N. 1979. Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. Lancet. 2(8154):1235-1236.
- Walk S.T., Alm E.W., Gordon D.M., Ram J.L., Toranzos G.A., Tiedje J.M., Whittam T.S. 2009. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. Appl Environ Microbiol 75:6534-6544.
- Walker C.L.F., Rudan I., Liu L., Nair H., Theodoratou E., Bhutta Z.A., O'Brien K.L., Campbell H., Black R.E. 2013. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. The Lancet, 381(9875):1405-1416.
- Wallace J.S., Cheasty T., Jones K. 1997. Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. J Appl Microbiol. 82(3):399-404.
- Wang G., Doyle M.P. 1998. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. J Food Prot. 61(6):662-667.
- Wang L., Curd H., Qu W., Reeves P.R. 1998. Sequencing of *Escherichia coli* O111 O-Antigen gene cluster and identification of O111-specific genes. J. Clin. Microbiol. 36:3182-3187.
- Wang L., Rothmund D., Curd H., Reeves P.R. 2000. Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 *fliC* genes implication for a DNA-based typing Scheme for *E. coli* O157:H7. J. Clin. Microbiol. 38:1786-1790.
- Wang L., Briggs C.E., Rothmund D., Fratamico P., Luchansky J.B., Reeves P.R. 2001. Sequence of the *E. coli* O104 antigen gene cluster and identification of O104 specific genes. Gene. 270(1-2):231-236.
- Wang L., Rothmund D., Curd H., Reeves P.R. 2003. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. J Bacteriol. 185(9):2936-2943.
- Wang L., Li Y., Mustaphai A. 2007. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. J Food Prot. 70(6):1366-1372.
- Wang Q., Wang S., Beutin L., Cao B., Feng L., Wang L. 2010. Development of a DNA microarray for detection and serotyping of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 48(6):2066-2074.
- Wani S.A., Bhat M.A., Smanta I., Nishikawa Y., Buchh A.S. 2003. Isolation and Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli*

- (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India. *Lett Appl Microbiol.* 37:12-126.
- Ward P., Roy D. 2005. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait.* 85:23-32.
- Warner J.E., Onderdonk A.B. 2003. Method for optimizing pulsed-field gel electrophoresis banding pattern data. *J Mol Diagn.* 5(1):21-27.
- Warszawsky B., Gutmanis I., Henry B., Dow J., Reffle J., Pollett G., Ahmed R., Aldom J., Alves D., Chagla A., Ciebin B., Kolbe F., Jamieson F., Rodgers F. 2002. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 related to animal contact at a petting zoo. *Can J Infect Dis.* 13(3):175-181.
- Wasteson Y., Johannessen G.S., Bruheim T., Urdahl A.M., O'Sullivan K., Rorvik L.M. 2005. Fluctuations in the occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 on a Norwegian farm. *Lett Appl Microbiol*40, 373-377.
- Watahiki M, Isobe J, Kimata K, Shima T, Kanatani J, Shimizu M, Nagata A, Kawakami K, Yamada M, Izumiya H, Iyoda S, Morita-Ishihara T, Mitobe J, Terajima J, Ohnishi M, Sata T. 2014. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan. *J Clin Microbiol.* 52(8):2757-2763.
- Weagant S.D., Bryant J.L., Bark D.H. 1994. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J. Food Prot.* 57:629-631.
- Wells J.G., Davis B.R., Wachsmuth I.K., Riley L.W., Remis R.S., Sokolow R., Morris G.K. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol.* 18(3):512-520.
- Wells J.G., Shipman L.D., Greene K.D., Sowers E.G., Green J.H., Cameron D.N., Downes F.P., Mantin M.L., Griffin P.M., Ostroff S.M., Potter M.E., Tauxe R.V., Wachsmuth I.K. 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29:985-989.
- Wendel A.M., Johnson D.H., Sharapov U., Grant J., Archer J.R., Monson T., Koschmann C., Davis J.P. 2009. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: the Wisconsin investigation. *Clin Infect Dis.* 48(8):1079-1086.
- Werber D., Fruth A., Liesegang A., Littmann M., Buchholz U., Prager R., Karch H., Breuer T., Tschäpe H., Ammon A. 2002. A multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance. *J Infect Dis.* 186(3):419-422.
- Werber D., Behnke S.C., Fruth A., Merle R., Menzler S., Glaser S., Kreienbrock L., Prager R., Tschape H., Roggentin P., Bockemuhl J., Ammon A. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany: different risk factors for different age groups. *Am. J. Epidemiol.* 165:425-434.
- Werber D., Beutin L., Pichner R., Stark K., Fruth A. 2008a. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in food and patients, Germany. *Emerg Infect Dis.* 14(11):1803-1806.
- Werber D., Frank C., Wadl M., Karch H., Fruth A., Stark K. 2008b. Looking for tips to find icebergs--surveillance of haemolytic uraemic syndrome to detect outbreaks of Shiga toxin-producing *E. coli* infection. *Euro Surveill.* 13(9).
- Werber, D, Bielaszewska, M, Frank, C, Stark, K, and Karch, H. 2011. Watch out for the even eviler cousin-sorbitol-fermenting *E. coli* O157. *Lancet.* 377: 298-299.
- Whittam T.S., Wolfe M.L., Wachsmuth I.K., Orskov F., Orskov I., Wilson R.A. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun.* 61(5):1619-1629.
- Whittam T.S., Reid S.D., Selander R.K. 1998. Mutators and long-term molecular evolution of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Emerg Infect Dis.* 4(4):615-7. Review.
- WHO. 1996. Food safety: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection. *Weekly Epidemiol. Rec.* 35:267.
- WHO. 1997. Food safety: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection. *Weekly Epidemiol. Rec.* 25:185.
- Wick L.M., Qi W., Lacher D.W., Whittam T.S. 2005. Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 187(5):1783-1791.
- Widiasih D.A., Ido N., Omoe K., Sugii S., Shinagawa K. 2004. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect.* 132(1):67-75.
- Wieler L.H., Bauerfeind R., Baljer G. 1992. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Zentralbl Bakteriol.* 276(2):243-253.
- Wieler L.H., Vieler E., Erpenstein C., Schlapp T., Steinrück H., Bauerfeind R., Byomi A., Baljer G. 1996. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. *J Clin Microbiol.* 34(12):2980-2984.
- Wieler L.H., Schwanitz A., Vieler E., Busse B., Steinrück H., Kaper J.B., Baljer G. 1998. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *J Clin Microbiol.* 36(6):1604-1607.
- Wieler L.H., Busse B., Steinrück H., Beutin L., Weber A., Karch H., Baljer G. 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)

- strains of serogroup O118 display three distinctive clonal groups of EHEC pathogens. *J Clin Microbiol.* 38(6):2162-2169.
- Wight J.P., Rhodes P., Chapman P.A., Lee S.M., Finner P. 1997. Outbreaks of food poisoning in adults due to *Escherichia coli* O111 and campylobacter associated with coach trips to northern France. *Epidemiol Infect.* 119(1):9-14.
- Williams A.P., Avery L.M., Killham K., Jones D.L. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the rhizosphere of maize grown in waste-amended soil. *J Appl Microbiol.* 102(2):319-326.
- Willshaw G.A., Smith H.R., Scotland S.M., Field A.M., Rowe B. 1987. Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding Vero cytotoxins: comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. *J. Gen. Microbiol.* 133:1309-1317.
- Willshaw G.A., Scotland S.M., Smith H.R., Rowe B. 1992. Properties of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. *J Infect Dis.* 166(4):797-802.
- Willshaw G.A., Smith H.R., Roberts D., Thirlwell J., Cheasly T., Rowe B. 1993. Examination of raw beef products for the presence of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157. *J. Appl. Bacteriol.* 75:420-426.
- Willshaw G.A., Cheasty T., Frost J.A., Threlfall E.J., Rowe B. 1996. Antimicrobial resistance of O157 VTEC in England and Wales. *ECV news 5. Notiziario dell'InstitutoSuperiore di Sanità.* 9, n°11 (Suppl.3):3-4.
- Willshaw G.A., Scotland S.M., Rowe B. 1997. Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli*. En *Escherichia coli: mechanisms of virulence.* Cambridge University Press: 421-448.
- Wilson M.W., Bettelheim K.A. 1980. Cytotoxic *Escherichia coli* serotypes. *Lancet.* 1(8161):201.
- Winfield M.D., Groisman E.A. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69(7):3687-3694.
- Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L.H., Karch H., Reeves P.R., Maiden M.C., Ochman H., Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 60(5):1136-1151.
- Wolfson J.J., Jandhyala D.M., Gorczyca L.A., Qadeer Z., Manning S.D., Hadler J., Rudrik J.T., Thorpe C.M. 2009. Prevalence of the operon encoding subtilase cytotoxin in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in the United States. *J Clin Microbiol.* 47:3058-3059.
- Xicohtencatl-Cortes J., Saldaña Z., Deng W., Castañeda E., Freer E., Tarr P.I., Finlay B.B., Puente J.L., Girón J.A. 2010. Bacterial macroscopic rope-like fibers with cytopathic and adhesive properties. *J Biol Chem.* 285(42):32336-32342.
- Yahata Y., Misaki T., Ishida Y., Nagira M., Watahiki M., Isobe J., Terajima J., Iyoda S., Mitobe J., Ohnishi M., Sata T., Taniguchi K., Tada Y., Okabe N. 2015. *E. coli* O111 Outbreak Investigation Team. Epidemiological analysis of a large enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O111 outbreak in Japan associated with haemolytic uraemic syndrome and acute encephalopathy. *Epidemiol Infect.* 143(13):2721-2732.
- Yamamoto S., Terai A., Yuri K., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12:85-90.
- Yamasaki S., Takeda Y. 1997. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 episode in Japan with a perspective on vero toxins (Shiga-like toxins). *Journal of Toxicology-Toxin Reviews,* 16(4):229-240.
- Yan X., Fratamico P.M., Needleman D.S., Bayles D.O. 2012. DNA sequence and analysis of a 90.1-kb plasmid in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O145:NM 83-75. *Plasmid.* 68(1):25-32.
- Yao Z., Wei G., Wang H., Wu L., Wu J., Xu J. 2013. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from vegetable fields with different cultivation patterns. *Appl Environ Microbiol.* 79(5):1755-1756.
- Yatsuyanagi J., Saito S., Itoh I., Sato H., Miyajima Y. 2000. A 9 year study of non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infections in Akita, Japan. 4th International Symposium and Workshop on "Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections". October 29-November 2. Kyoto, Japan.
- Yoon J.W., Lim J.Y., Park Y.H., Hovde C.J. 2005. Involvement of the *Escherichia coli* O157:H7 (pO157) *ecf* operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs. *Infect Immun.* 73:2367-2378.
- Yoshii N., Ogura Y., Hayashi T., Ajiro T., Sameshima T., Nakazawa M., Kusumoto M., Iwata T., Akiba M. 2009. pulsed-field gel electrophoresis profile changes resulting from spontaneous chromosomal deletions in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during passage in cattle. *Appl Environ Microbiol.* 75(17):5719-5726.
- Yu F., Chen X., Zheng S., Han D., Wang Y., Wang R., Wang B., Chen Y. 2017. Prevalence and genetic diversity of human diarrheagenic *Escherichia coli* isolates by multilocus sequence typing. *Int J Infect Dis.* 67:7-13.
- Zadik P.M., Chapman P.A., Siddons C.A. 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol.* 39(2):155-158.
- Zárate M.S., Romano V., Nieves J., Smayevsky J. 2014. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias, *Revista Argentina de Microbiología,* Volume 46, Issue 2. Pages 98-102.

- Zhang T., Wang H., Wu L., Lou J., Wu J., Brookes P.C., Xu J. 2013. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from Jiangsu Province, China. *PLoS One*. 8(12):e81178.
- Zhang W., Bielaszewska M., Kuczius T., Karch H. 2002a. Identification, characterization, and distribution of Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 40:1441-1446.
- Zhang W., Mellmann A., Sonntag A.K., Wieler L., Bielaszewska M., Tschäpe H., Karch H., Friedrich A.W. 2007. Structural and functional differences between disease-associated genes of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O111. *Int J Med Microbiol.* 297(1):17-26.
- Zhang W.L., Bielaszewska M., Bockemühl J., Schmidt H., Scheutz F., Karch H. 2000a. Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the eae gene belong to the H11 clonal complex. *J. Clin. Microbiol.* 38:2989-2993.
- Zhang W.L., Bielaszewska M., Liesegang A., Tschape H., Schmidt H., Bitzan M., Karch H. 2000b. Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:2134-2140.
- Zhang W.L., Kohler B., Oswald E., Beutin L., Karch H., Morabito S., Caprioli A., Suerbaum S., Schmidt H. 2002b. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12):4486-4492.
- Zhao S., Mitchell S.E., Meng J., Kresovich S., Doyle M.P., Dean R.E., Casa A.M., Weller J.W. 2000. Genomic typing of *Escherichia coli* O157:H7 by semi-automated fluorescent AFLP analysis. *Microbes Infect.* 2:107-113.
- Zhao T., Doyle M.P., Besser R.E. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2526-2530.
- Zhao T., Doyle M.P., Shere J., Garber L. 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1290-1293.
- Zhou Z., Li X., Liu B., Beutin L., Xu J., Ren Y., Feng L., Lan R., Reeves P.R., Wang L. 2010. Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor. *PLoS One*. 5(1):e8700.
- Ziebell K.A., Read S.C., Johnson R.P., Gyles C.L. 2002. Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins. *Res Microbiol.* 153(5):289-300.
- Ziese T., Anderson Y., De Jong B., Lofdahl S., Ramberg M. 1996. Outbreak of *Escherichia coli* O157 in Sweden. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles= European Communicable Disease Bulletin*, 1(1):2-3.
- Zweifel C., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Stephan R. 2004. Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland. *Int J Food Microbiol.* 95(1):19-27.
- Zweifel C., Schumacher S., Blanco J.E., Blanco M., Tasara T., Blanco J., Stephan R. 2005. Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. *Veterinary Microbiology* 105:37-45.
- Zweifel C., Cernela N., Stephan R. 2013. Detection of the emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11/H-sequence type 29 (ST29) clone in human patients and healthy cattle in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(17): 5411-5413.
- Zweifel C., Fierz L., Cernela N., Laaksonen S., Fredriksson-Ahomaa M., Stephan R. 2017. Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Slaughtered Reindeer from Northern Finland. *J Food Prot.* 80(3):454-458.