

Remigio
Martínez
Pérez

Aplicación de la técnica de análisis de secuencias repetitivas en tándem (MLVA) en la subtipificación y seguimiento epidemiológico de aislados de cepas verotoxigénicas y enterohemorrágicas de *Escherichia coli* de origen humano y animal

2020

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

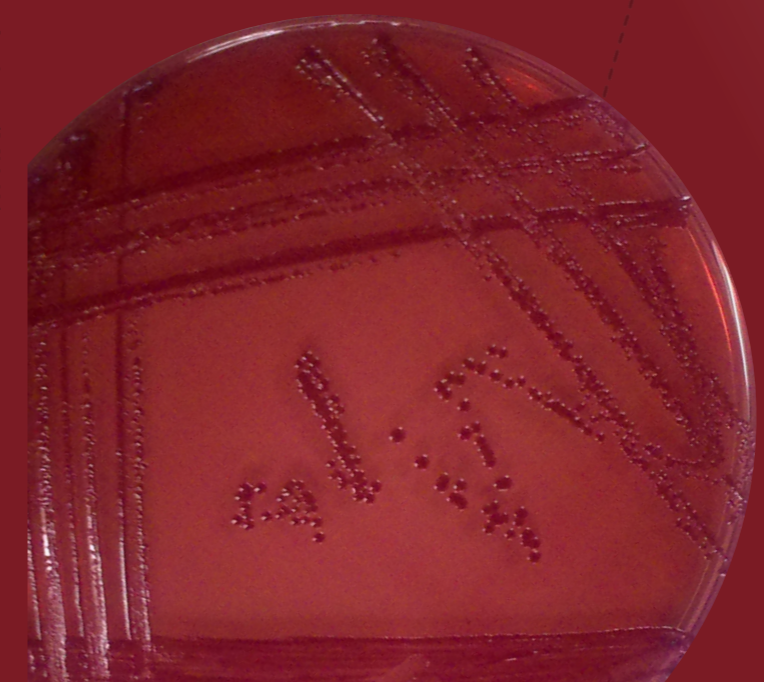


TESIS DOCTORAL

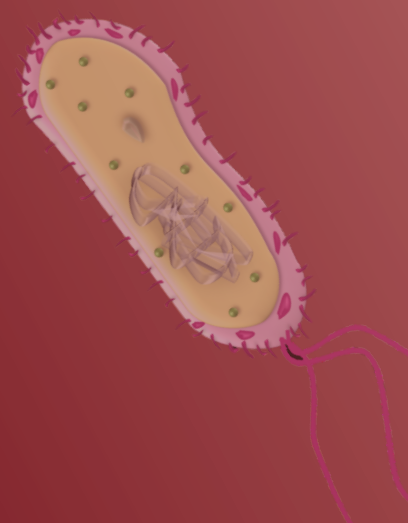
Aplicación de la técnica de análisis de secuencias repetitivas en tándem (MLVA) en la subtipificación y seguimiento epidemiológico de aislados de cepas verotoxigénicas y enterohemorrágicas de *Escherichia coli* de origen humano y animal

Remigio Martínez Pérez

PROGRAMA DE DOCTORADO DE SALUD PÚBLICA Y ANIMAL



2020





TESIS DOCTORAL

Aplicación de la técnica de análisis de secuencias repetitivas en tándem (MLVA) en la subtipificación y seguimiento epidemiológico de aislados de cepas verotoxigénicas y enterohemorrágicas de *Escherichia coli* de origen humano y animal

Remigio Martínez Pérez

PROGRAMA DE DOCTORADO DE SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

Cáceres, 2020

D. **Juan Manuel Alonso Rodríguez**, Doctor en Veterinaria y Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura

INFORMA

que la Tesis Doctoral titulada “Aplicación de la técnica de análisis de secuencias repetitivas en tándem (MLVA) en la subtipificación y seguimiento epidemiológico de aislados de cepas verotoxigénicas y enterohemorrágicas de *Escherichia coli* de origen humano y animal”, presentada por el Licenciado en Veterinaria D. Remigio Martínez Pérez, ha sido realizada bajo mi dirección en la Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología de la Facultad de Veterinaria.

Hallándose concluida, y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación para su defensa ante el tribunal que ha de juzgarla.

En Cáceres, a 13 de marzo de 2020

La conformidad del director de la tesis consta en el original en papel de esta Tesis Doctoral

Fdo.: Dr. Juan Manuel Alonso Rodríguez

D. **Joaquín Rey Pérez**, Doctor en Veterinaria y Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura

INFORMA

que la Tesis Doctoral titulada “Aplicación de la técnica de análisis de secuencias repetitivas en tándem (MLVA) en la subtipificación y seguimiento epidemiológico de aislados de cepas verotoxigénicas y enterohemorrágicas de *Escherichia coli* de origen humano y animal”, presentada por el Licenciado en Veterinaria D. Remigio Martínez Pérez, ha sido realizada bajo mi dirección en la Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología de la Facultad de Veterinaria.

Hallándose concluida, y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación para su defensa ante el tribunal que ha de juzgarla.

En Cáceres, a 13 de marzo de 2020

La conformidad del director de la tesis consta en el original en papel de esta Tesis Doctoral

Fdo.: Dr. Joaquín Rey Pérez

D. **Sergio Sánchez Prieto**, Doctor en Veterinaria e Investigador adscrito al Laboratorio de Referencia e Investigación de infecciones Bacterianas Transmitidas por el Agua y los Alimentos del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

INFORMA

que la Tesis Doctoral titulada “Aplicación de la técnica de análisis de secuencias repetitivas en tándem (MLVA) en la subtipificación y seguimiento epidemiológico de aislados de cepas verotoxigénicas y enterohemorrágicas de *Escherichia coli* de origen humano y animal”, presentada por el Licenciado en Veterinaria D. Remigio Martínez Pérez, ha sido realizada bajo mi dirección en la Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología de la Facultad de Veterinaria.

Hallándose concluida, y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación para su defensa ante el tribunal que ha de juzgarla.

En Cáceres, a 13 de marzo de 2020

La conformidad del director de la tesis consta en el original en papel de esta Tesis Doctoral

Fdo.: Dr. Sergio Sánchez Prieto

AGRADECIMIENTOS

Siempre he sido de la opinión de que pocos hallazgos o trabajos de científicos pueden ser atribuidas a la labor de un solo investigador. De hecho, la consecución de avances en el conocimiento científico es el producto del trabajo y la cooperación de la comunidad científica. La ciencia es, por tanto, una aventura colectiva. Es por ello, que escribo estas líneas de agradecimiento buscando el reconocimiento de todas aquellas personas que han contribuido al presente trabajo, o que han compartido o comparten mi día a día y, por tanto, son en parte responsables de mi formación como persona e investigador.

En primer lugar, debo agradecer a los doctores Juan Manuel Alonso, Sergio Sánchez y Joaquín Rey, directores de esta tesis doctoral, por su paciencia y dedicación a ella y a mi formación. También debo agradecerles la buena acogida que me han dado, su guía y todo lo que de ellos he podido aprender.

A Raquel Rubio y Noelia Tejero, como compañeras durante algunos años, por su buen hacer en el laboratorio y su capacidad de organización, de la que tanto pude aprender.

Al doctor Alfredo García, por su ímpetu diario, su fortaleza y su buen humor. Gracias por tu optimismo incombustible y a sus ganas de ayudar, y por ser un referente en muchos aspectos.

Al doctor Jose María Morán, en parte responsable de que decidiera tomar este camino. Por ser un referente en ciencia y por su compañerismo y guía durante nuestros años de labor en el Hospital Clínico Veterinario de la UEx.

Al doctor Jose Manuel Benítez, compañero de trabajo de estos últimos años. Por su compañerismo y la buena sinergia que facilita nuestra labor diaria, así como por darme su amistad y fuerzas para terminar este trabajo.

A la familia de Infecciosas, por ser precisamente eso, una familia. Al doctor Javier Hermoso y Miguel Hermoso. En especial, a todos los que por esta Unidad han pasado y con los que he compartido todos estos años: Waldo García, David Risco, Pilar Gonçalves, Javier Galapero, Jesús María Cuesta, María Cortés, Inés Hurtado, Belinda Corchero, María Bravo, María Gil, Pedro Fernández, Rosario Cerrato, Lidia Balibrea y Natalia Jiménez.

A las doctoras Aurora Echeita y Silvia Herrera, de la Unidad de Enterobacterias del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Madrid, por acogerme durante tres meses y por ayudarme en este trabajo y formarme en el aprendizaje de las técnicas de caracterización de enterobacterias.

A los doctores Alfredo Caprioli, Stefano Morabito y a las doctoras Rosangela Tozzoli y Valeria Michelacci, del Community Reference Laboratory for *E. coli*, Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Unit of Foodborne Zoonoses and Veterinary Epidemiology del Istituto Superiore di Sanità de Roma por la formación recibida durante la estancia que realicé en su laboratorio. También, como no, a todo el personal del centro y a los compañeros que conocí durante la estancia, en especial al Dr. Casmir Ifeanyi, del que guardo un grato recuerdo.

Al doctor Juan Carlos Parejo de la Unidad de Genética de Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, por su inestimable ayuda solventando dudas y su colaboración para la realización de las técnicas.

A todos los amigos más o menos ajenos al tema, por su apoyo, pero sobre todo por haberme dado ánimos y ganas cuando las fuerzas flaqueaban.

A mi familia, uno de los pilares que sostienen mi vida. A mis padres, Remigio y Teresa, porque nunca podré agradecerles lo suficiente haberme convertido en lo que soy, por ser un referente, por su honestidad y por haberme trasladado sus valores de integridad, trabajo diario, optimismo y ganas de disfrutar y vivir día a día. A mis hermanas, Ana y Elena, por su paciencia y por aguantar nuestras discusiones, así como ser referente en tantos aspectos de mi vida. Y como no, a todos los que ya no están y siguen ahí dándome fuerzas.

A la Junta de Extremadura, por la beca pre-doctoral del personal investigador que me fue concedida para la realización de este trabajo (PRE06053).

Finalmente, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la que es mi mitad y vida desde hace más de dos años. Porque sin su aliento, su apoyo y su paciencia no habría podido terminar este trabajo. Gracias de corazón, Elena.

Remi

ÍNDICES

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	23
RESUMEN	29
SUMMARY	33
1. INTRODUCCIÓN.....	39
1.1. Características de <i>Escherichia coli</i>	39
1.2. Características de los <i>E. coli</i> verotoxigénicos.....	41
1.3. Situación en Europa de los <i>E. coli</i> verotoxigénicos.....	42
1.4. Situación en España de los <i>E. coli</i> verotoxigénicos.....	50
1.5. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> verotoxigénicos	53
1.5.1. Factores de virulencia codificados en el cromosoma bacteriano: isla de patogenicidad LEE, intimina y otras islas de patogenicidad	54
1.5.2. Factores de virulencia codificados en plásmidos.....	56
1.5.3. Factores de virulencia codificados por bacteriófagos: toxinas Shiga	57
1.6. Presentaciones clínicas de la infección por <i>E. coli</i> verotoxigénicos.....	61
1.7. Reservorio animal de <i>E. coli</i> verotoxigénicos	61
1.8. Técnicas de subtipificación de <i>E. coli</i> verotoxigénicos	63
1.8.1. Electroforesis en campo pulsante	63
1.8.2. Análisis de secuencias repetitivas en tándem	65
2. OBJETIVOS.....	71
3. MATERIALES Y MÉTODOS	75
3.1. Aislados objeto de estudio.....	75
3.2. Cepas control	83
3.3. Cultivo y extracción de ADN para el análisis de secuencias repetitivas en tándem	83
3.4. Análisis de secuencias repetitivas en tándem siguiendo el protocolo de Noller <i>et al.</i> (2003) para <i>E. coli</i> O157:H7	83
3.5. Análisis de secuencias repetitivas en tándem siguiendo el protocolo modificado de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) para <i>E. coli</i> O157:H7 y ECVT no-O157	85
3.6. Análisis de los datos de secuencias repetitivas en tándem obtenidos con ambos protocolos	90
3.7. Técnica de Electroforesis en campo pulsante	91

4. RESULTADOS	97
4.1. Subtipificación de aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 mediante la técnica de MLVA con el protocolo de Noller <i>et al.</i> (2003)	97
4.2. Subtipificación de aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 mediante la técnica de MLVA con el protocolo de Lindstedt <i>et al.</i> (2007)	111
4.3. Análisis combinado de los resultados obtenidos para la subtipificación de aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 con todas las técnicas empleadas	124
4.3.1.Subtipificación de aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 combinando el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) con la técnica de PFGE.....	124
4.3.2.Subtipificación de aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 combinando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) con la técnica de PFGE	126
4.3.3.Subtipificación de aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 combinando los protocolos de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) y Lindstedt <i>et al.</i> (2007)	128
4.3.4.Subtipificación de aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 combinando los protocolos de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) y Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y la técnica de PFGE .	130
4.4. Subtipificación de aislados ECVT de los serogrupos O5, O91 y O146 mediante la técnica de MLVA con el protocolo de Lindstedt <i>et al.</i> (2007)	132
5. DISCUSIÓN.....	153
6. CONCLUSIONES	177
7. BIBLIOGRAFÍA.....	181

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Número de casos confirmados y tasas de notificación de zoonosis en la UE en 2017 (EFSA and ECDC, 2018).....	43
Ilustración 2. Casos de infección humana confirmados en la UE ^(a) por serogrupo entre 2007 y 2010 (EFSA, 2013).	47
Ilustración 3. Serotipos más frecuentemente confirmados y notificados en casos de infección en seres humanos entre 2007 y 2010 (basado en datos de TESSy suministrados por el ECDC) y en 2011 (basados en datos de la EFSA y el ECDC) en la UE (EFSA, 2013).	47
Ilustración 4. Presentación clínica de las infecciones por ECVT en seres humanos confirmadas en la UE en el periodo 2007-2010 (basado en datos de TESSy aportados por ECDC) (EFSA, 2013).....	49
Ilustración 5. Estimación de casos reales de enfermedad por ECVT al año en la UE, basados en la aplicación de factores multiplicadores de enfermedad (EFSA, 2013).	50
Ilustración 6. Estructura de la toxina Shiga determinada por cristalografía de rayos X (Fraser <i>et al.</i> , 1994) (PDB ID: 1DM0). Subunidad A en rojo, subunidades B en verde y puente disulfuro en azul. Original de Bergan <i>et al.</i> (2012).	58
Ilustración 7. Electroferograma del marcador de peso molecular GeneScantm 600 LIZ [®] (Life Technologiestm).....	87
Ilustración 8. Tamaño aproximado (en kb) de las bandas correspondientes al perfil de la cepa H9812 sometida a restricción con <i>Xba</i> I y electroforesis en las condiciones estándar de PFGE de PulseNet específicas para <i>E. coli</i> O157:H7.....	93
Ilustración 9. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003).	102
Ilustración 10. Árbol de mínima expansión correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados mediante el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003).	103
Ilustración 11. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados mediante PFGE.	104
Ilustración 12. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los nueve aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 1 con el protocolo de la técnica de PFGE.	105
Ilustración 13. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los dos aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 3 con el protocolo de la técnica de PFGE.	105
Ilustración 14. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los siete aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen bovino estudiados de la ganadería 1 con el protocolo de la técnica de PFGE.	105
Ilustración 15. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los dos aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 procedentes de ciervos estudiados de la finca 1 con el protocolo de la técnica de PFGE.	106
Ilustración 16. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) de los cinco aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados en pacientes hospitalizados con gastroenteritis.	106

Ilustración 17. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) de los tres aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen humano y un aislado de origen suido estudiados.	106
Ilustración 18. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) y en el coeficiente de Dice (PFGE) de los cuatro aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 2.	107
Ilustración 19. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) y en el coeficiente de Dice (PFGE) de los tres aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen suido estudiados de la finca 2.....	107
Ilustración 20. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) correspondiente a los 27 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 sin relación epidemiológica conocida.....	108
Ilustración 21. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice correspondiente a los 27 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 sin relación epidemiológica conocida con el protocolo de la técnica de PFGE.	109
Ilustración 22. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) y en el coeficiente de Dice (PFGE) de cuatro aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino, tres aislados de origen humano y un aislado procedente de jabalí. ...	110
Ilustración 23. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) y en el coeficiente de Dice (PFGE) de cuatro aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino, tres aislados de origen humano y un aislado procedente de jabalí. ...	110
Ilustración 24. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	117
Ilustración 25. Árbol de mínima expansión correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados mediante el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	118
Ilustración 26. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados con el protocolo de PFGE.	119
Ilustración 27. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de los nueve aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 1 con el protocolo de PFGE.....	120
Ilustración 28. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de los cuatro aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 2 con el protocolo de PFGE.....	120
Ilustración 29. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de dos aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 3 con el protocolo de PFGE.....	120
Ilustración 30. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de los siete aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen bovino estudiados de la ganadería 1 con el protocolo de PFGE.	120
Ilustración 31. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de dos aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 procedentes de ciervo estudiados de la finca 1 con el protocolo de PFGE.....	121
Ilustración 32. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de tres aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 procedente de jabalí estudiados de la finca 2 con el protocolo de PFGE.	121
Ilustración 33. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) de los cinco aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados en pacientes hospitalizados con gastroenteritis.	121

Ilustración 34. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de similaridad de Dice (PFGE) de tres aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen humano, un aislado procedente de jabalí y dos procedentes de ciervo estudiados.	121
Ilustración 35. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) correspondiente a los 27 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 sin relación epidemiológica conocida.....	122
Ilustración 36. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice correspondiente a los 27 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 sin relación epidemiológica conocida con el protocolo de PFGE.	122
Ilustración 37. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de dos aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 sin relación epidemiológica procedentes de ganado bovino y jabalí con el protocolo de PFGE.	123
Ilustración 38. Dendrogramas basado en el coeficiente de Dice (PFGE) de cuatro aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino y bovino.....	123
Ilustración 39. Dendrograma basado en el coeficiente de Dice (PFGE) de cinco aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 de origen ovino.	123
Ilustración 40. Dendrograma basado en la media de los resultados obtenidos aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) y técnica de PFGE correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados.....	125
Ilustración 41. Dendrograma basado en la media de los resultados obtenidos aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y la técnica de PFGE correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados.....	127
Ilustración 42. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) y Lindstedt <i>et al.</i> (2007) correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados.....	129
Ilustración 43. Dendrograma basado en la media de los resultados obtenidos aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003) y Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y la técnica de PFGE correspondiente a los 63 aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados.....	131
Ilustración 44. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 24 aislados de ECVT O5 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	138
Ilustración 45. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 52 aislados de ECVT O91 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	139
Ilustración 46. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 39 aislados de ECVT del serogrupo O146 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	140
Ilustración 47. Árbol de mínima expansión correspondiente a los 115 aislados de ECVT O5, O91 y O146 estudiados mediante el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	141
Ilustración 48. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice correspondiente a los 24 aislados de ECVT O5 estudiados mediante PFGE.....	141
Ilustración 49. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice correspondiente a los 52 aislados de ECVT O91 estudiados mediante PFGE.....	142
Ilustración 50. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice correspondiente a los 39 aislados de ECVT O146 estudiados mediante PFGE.....	143

Ilustración 51. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O5 de la explotación 1 estudiados.....	145
Ilustración 52. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O5 de la explotación 2 estudiados.....	145
Ilustración 53. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O5 de la explotación 11 estudiados.....	146
Ilustración 54. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O91 de la explotación 1 estudiados.....	146
Ilustración 55. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O91 de la explotación 2 estudiados.....	147
Ilustración 56. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O91 de la explotación 7 estudiados.....	148
Ilustración 57. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O146 de la explotación 1 estudiados.....	149
Ilustración 58. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O146 de la explotación 7 estudiados.....	150
Ilustración 59. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O146 de la explotación 11 estudiados.....	150

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos y tasas de notificación por cada 100 000 habitantes de infecciones humanas por ECVT entre 2013 y 2017 en países miembros y asociados a la UE (EFSA and ECDC, 2018).....	44
Tabla 2. Distribución de los 20 serogrupos más frecuentes entre los casos humanos de infección por VTEC confirmados en la UE entre 2015 y 2017 (EFSA and ECDC, 2018).....	46
Tabla 3. Clasificación de ECVT en seropatotipos. Tabla basada en el trabajo de Karmali <i>et al.</i> (2003).	48
Tabla 4. Casos de infección por cepas de ECVT en seres humanos declarados por España entre 2005 y 2013. Datos basados en los informes de la EFSA y el ECDC (EFSA y ECDC, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015).	51
Tabla 5. Relación de brotes causados por ECVT en España. Tabla modificada de Sánchez (2008). 52	
Tabla 6. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiados. .	76
Tabla 7. Características genotípicas de los aislados de ECVT del serogrupo O5 estudiados.....	79
Tabla 8. Características genotípicas de los aislados de ECVT del serogrupo O91 estudiados.....	80
Tabla 9. Características genotípicas de los aislados de ECVT del serogrupo O146 estudiados.....	82
Tabla 10. Cebadores empleados en el protocolo de la técnica de MLVA descrita por Noller <i>et al.</i> (2003).	83
Tabla 11. Cebadores empleados para amplificar las VNTR basados en el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	89
Tabla 12. Perfiles de MLVA asignados a los aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 aplicando el protocolo de MLVA de Noller <i>et al.</i> (2003).....	97
Tabla 13. Características de las VNTR y resultados obtenidos en los aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 aplicando el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller <i>et al.</i> (2003).	99
Tabla 14. Número de repeticiones en tándem y tamaño del producto de electroforesis capilar obtenidos en cada VNTR aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) con la cepa EDL933.	111
Tabla 15. Conversión en alelos de los productos de PCR obtenidos en la electroforesis capilar aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007), tomando como referencia los productos obtenidos y secuenciados a partir de la cepa EDL933.	111
Tabla 16. Perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 aplicando el protocolo de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	112
Tabla 17. Características de las VNTR y resultados obtenidos en los aislados de <i>E. coli</i> O157:H7 aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	114
Tabla 18. Perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de ECVT O5 aplicando el protocolo de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	132
Tabla 19. Perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de ECVT O91 aplicando el protocolo de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	133
Tabla 20. Perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de ECVT O146 aplicando el protocolo de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	134
Tabla 21. Características de las VNTR y resultados obtenidos en los aislados de ECVT O5, O91 y O146 aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	135
Tabla 22. Número de aislados, distribución de alelos y perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de ECVT O5, O91 y O146 aplicando el protocolo de Lindstedt <i>et al.</i> (2007).	136

Tabla 23. Correspondencia entre perfiles de las técnicas de PFGE y MLVA con el protocolo de Lindstedt <i>et al.</i> (2007) identificados en los aislados de cada explotación	137
Tabla 24. Referencias bibliográficas, serogrupos y antígeno H de <i>E. coli</i> en los que se ha estudiado la amplificación en la VNTR CVN003.	165

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A	Adenina
<i>aaIC</i>	Gen de una proteína secretada por <i>Escherichia coli</i> enteroagregativos. Ing.: <i>secreted protein of EAEC</i>
<i>aggR</i>	Gen de una proteína activadora presente en un plásmido pAA.
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A/E	Ing.: <i>attaching and effacing</i>
BA	Badajoz
C	Citosina
CC	Cáceres
CH	Colitis hemorrágica
CRISPR	Secuencia con repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (ing: <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>).
CSB	Tampón para suspensiones celulares (ing.: <i>cell suspension buffer</i>)
DLV	Ing.: <i>double locus variant</i>
<i>eae</i>	Gen íntima. Ing.: <i>E. coli</i> attaching and effacing
ECAI	<i>Escherichia coli</i> con adherencia invasiva
ECAD	<i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades
ECCDC	<i>Escherichia coli</i> con capacidad para desprender células
ECEA	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativos
ECEAVT	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativos y productores de verotoxinas
ECEH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágicos
ECEI	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivos
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénicos
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénicos

Abreviaturas

ECMN	<i>Escherichia coli</i> asociadas a la meningitis neonatal
ECNT	<i>Escherichia coli</i> necrotóxicas
ECPA	<i>Escherichia coli</i> patogénicos aviares
ECSeP	<i>Escherichia coli</i> septicémicos o bacteriémicos
ECVT	<i>Escherichia coli</i> verotoxigénicos
ECUP	<i>Escherichia coli</i> uropatogénicos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (ing.: <i>European Food Safety Authority</i>)
EpeA	Proteína autotrasportadora
ER	Retículo endoplasmático
Esp	Proteína serina proteasa
E-Hly	Enterohemolisina
<i>ehxA</i>	Gen de la enterohemolisina
FVCC	Aislado de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 de la Facultad de Veterinaria de Cáceres
FCVTEC	Aislado de <i>Escherichia coli</i> verotoxigénico no-O157 de la Facultad de Veterinaria de Cáceres
G	Guanina
Gb	Globotetraosilceramida
HAS	Serotipo asociado a SUH, del inglés: <i>HUS associated serogroup</i>)
Hes	Hemaglutinina de <i>Escherichia coli</i> productores de toxina Shiga
ID	Índice de diversidad
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (ing: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
KatP	Proteína con actividad catalasa-peroxidasa
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LAA	Ing.: <i>locus of adhesion and autoaggregation</i>

LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LEE	Ing.: <i>locus of enterocyte Effacement</i>
LPS	Lipopolisacárido
LREC	Laboratorio de Referencia para <i>Escherichia coli</i> de la Universidad de Santiago de Compostela, con sede en Lugo, España
M	En secuencias de ácido nucleico. Base con residuo amino (adenina o citosina)
Mb	Megabase
MLVA	Técnica del análisis de secuencias repetitivas en tándem
nm	Nanómetro
MST	Árbol de mínima expansión
NM	Antígeno H ausente (cepa no móvil)
NT	No tipable
O-rough	Ing.: áspero. Denominación para cepas de <i>Escherichia coli</i> que carecen de cadenas O en el lipopolisacárido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (ing.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Electroforesis en campo pulsante (ing.: <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>)
PPT	Púrpura trombocitopénica trombótica
R	En secuencias de ácido nucleico. Residuo con base púrica no especificado (adenina o guanina)
RFLP	Técnica de análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción
Saa	Proteína adhesina autoaglutinante
SE	Ing.: <i>subtilase-encoding</i>
ShiA	Proteína de estructura similar a la descrita en cepas del género <i>Shigella</i> con capacidad para modular la respuesta inflamatoria
SLT	Toxina <i>Shiga-like</i>
SLV	Ing.: <i>single locus variant</i>

Abreviaturas

STEC	<i>Escherichia coli</i> productores de toxinas Shiga (ing.: <i>Shiga toxin-producing E. coli</i>)
Stx	Toxina Shiga
stx	Gen de la toxina Shiga
SubAB	Citotoxina subtilasa
SUH	Síndrome urémico hemolítico
T	Timina
TAE	Tampón de acetato y ácido etilendiaminotetraacético
TBE	Tampón tris-borato-ácido etilendiaminotetraacético
TE	Tampón tris-ácido etilendiaminotetraacético
Tia	Factor de invasión toxigénico
Tir	Proteína receptor traslocado de intimina
ToxB	Proteína asociada a capacidad de adhesión a células en cultivos, homóloga a las descritas en clostridios
TR	Repetición en tándem
TSA	Agar triptona-soja
TSB	Caldo de triptona-soja
UEx	Universidad de Extremadura
USC	Universidad de Santiago de Compostela
UV	Luz ultravioleta
VNTR	Ing.: <i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
VT	Verotoxina
W	En secuencias de ácido nucleico. Base con enlace débil (adenina o timina)
WGS	Secuenciación del genoma completo (ing.: <i>whole genome sequencing</i>)
x	Concentración de la disolución
Y	En secuencias de ácido nucleico. Residuo con base pirimidínica no especificado (citosina o timina)

RESUMEN

RESUMEN

Los *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) son importantes patógenos para los seres humanos, responsables de procesos patológicos graves como la colitis hemorrágica o el síndrome urémico hemolítico. La electroforesis en campo pulsante (PFGE) es la técnica de referencia para la subtipificación de esta bacteria y de otros enteropatógenos. No obstante, presenta algunas limitaciones como son: su laboriosidad, incapacidad para caracterizar algunas cepas, el coste de los equipamientos y su interpretación, por lo que se sigue investigando para encontrar métodos alternativos de tipado. La técnica de análisis de secuencias repetitivas en tándem (MLVA) basada en la amplificación de secuencias repetitivas en tándem mediante PCR, ha sido empleada igualmente con éxito para el estudio de aislados ECVT. Sin embargo, se necesitan estudios con un mayor número de aislados y diferentes situaciones epidemiológicas que permitan demostrar su aplicabilidad.

Para abordar estas necesidades, se estudió la aplicabilidad de la técnica de MLVA empleando dos protocolos para la subtipificación de 181 aislados de *E. coli* O157:H7 y ECVT no-O157 de los serogrupos O5, O91 y O146, obtenidos a partir de distintos orígenes con y sin información epidemiológica conocida.

Ambos protocolos de la técnica de MLVA demostraron su aplicabilidad para la subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7. Además, el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller *et al.* (2003), empleado en combinación con la técnica de PFGE, aumentó su poder de discriminación, mejorando la capacidad del PFGE para diferenciar entre aislados con y sin relación epidemiológica.

Sin embargo, el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* (2007) empleado para la subtipificación de aislados ECVT no-O157 de los serogrupos O5, O91 y O146 no permitió una discriminación apropiada para su aplicación sistemática, siendo incapaz de clasificar clones de ECVT identificados mediante la técnica de PFGE presentes en individuos de una misma explotación. No obstante, la técnica ha permitido el seguimiento de aislados secuenciales temporales de los serogrupos O5, O91 y O146 procedentes de un mismo individuo. Se necesitan nuevos protocolos de la técnica de MLVA con secuencias repetitivas que aumenten el poder de discriminación de la misma para el análisis de aislados ECVT no-O157. Éstos podrían diseñarse gracias a la generalización de nuevas técnicas como la WGS, ya que se dispone de una mayor cantidad de genomas completos de ECVT no-O157.

SUMMARY

SUMMARY

Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) are important pathogens for humans, responsible for serious pathological processes such as haemorrhagic colitis or haemolytic uremic syndrome. The Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) is the current “gold standard” technique for the genotypic characterization of this bacterium and other enteropathogens. However, it has some limitations such as laboriousness, inability to characterize some strains, high cost of equipment and hard interpretation, so that research continues to find other alternative typing methods. The Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) technique is based on the amplification of repetitive sequences by PCR. It has also been successfully used for the study of VTEC isolates. However, studies with greater number of isolates and different epidemiological situations are needed to demonstrate its applicability.

To address these needs, the applicability of the MLVA technique was studied using two protocols for the genotypic characterization of 181 isolates of *E. coli* O157:H7 and VTEC non-O157 of serogroups O5, O91 and O146. Isolates were obtained from different origins and had known and unknown epidemiological information.

Both MLVA protocols demonstrated its applicability for the genotypic characterization of *E. coli* O157:H7 isolates. Moreover, the MLVA protocol described by Noller *et al.* (2003), together with PFGE technique, increased its discriminative power, improving PFGE ability to differentiate among isolates with and without known epidemiological information.

However, the MLVA protocol described by Lindstedt *et al.* (2007) for the genotypic characterization of VTEC isolates non-O157 of serogroups O5, O91 and O146 did not allow an appropriate discrimination for its systematic application. It was unable to classify clones of VTEC strains identified by PFGE that were present in animals from the same herd. However, the technique has allowed the monitoring over time isolates from serogroups O5, O91 and O146 belonging to the same animal. Therefore, new MLVA protocols with other repetitive sequences are needed in order to increase the discrimination power of the technique for the analysis of non-O157 VTEC strains. These could be designed thanks to the generalization of new techniques such as WGS, since a greater number of complete genomes of non-O157 ECVT are available.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características de *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, incluido en la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1986; Pohl, 1993; Gyles, 1994), que a su vez engloba a otros géneros como *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*, entre otros muchos. Esta bacteria fue descrita en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich después de aislarla en heces de un niño sano, denominándose inicialmente con el nombre de *Bacterium coli commune* (Escherich, 1885; Sussman, 1985).

Esta bacteria puede encontrarse en el tracto digestivo de la mayor parte de los mamíferos, ya que forma parte de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa comensal y saprofita (Hartl and Dykhuizen, 1984; Berg, 1996; Gordon and Cowling, 2003; Kaper *et al.*, 2004; Vogeleer *et al.*, 2014). Dentro del tracto digestivo, se localiza en el intestino grueso, sobre todo en ciego y colon (Tenaillon *et al.*, 2010), donde se desarrolla en la capa de mucus que recubre las células epiteliales y es excretada junto con esta capa ya degradada a través de las heces (Poulsen *et al.*, 1994).

E. coli es una de las primeras bacterias que coloniza el intestino humano durante la infancia (Tenaillon *et al.*, 2010). La relación entre *E. coli* y el hospedador puede definirse como comensalismo, ya que la bacteria obtiene nutrientes (Conway *et al.*, 2004), un ambiente estable y protección frente a determinados estreses, así como transporte y diseminación (Tenaillon *et al.*, 2010). Por otro lado, la microbiota intestinal entre la que se encuentra *E. coli* también ofrece ciertos beneficios al hospedador, previniendo la colonización por otras bacterias patógenas mediante distintos mecanismos (Rastegar Lari *et al.*, 1990; Volllaard and Clasener, 1994; Hudault *et al.*, 2001; Schamberger *et al.*, 2004).

La facilidad para cultivar esta bacteria en el laboratorio ha motivado que se use como modelo microbiano en estudios bioquímicos y genéticos, destacando por ello especialmente la cepa no patógena K-12 (Bachmann, 1972). De igual forma, debido a su localización en el intestino y a su abundante excreción con las heces, su presencia en el medio ambiente, agua y alimentos, se emplea como un indicador de contaminación fecal reciente (Clesceri *et al.*, 1998).

Introducción

Por otra parte, algunas cepas de *E. coli* han adquirido ciertos atributos de virulencia que les otorgan la capacidad de adaptarse a nuevos nichos y causar una amplia variedad de enfermedades (Kaper *et al.*, 2004). Esta patogenicidad no se debe a un solo factor de virulencia, sino a una combinación de genes que codifican toxinas, factores de colonización y otras funciones requeridas para causar infección (Kaper *et al.*, 2004). Las cepas patógenas de *E. coli* presentes en seres humanos y animales suelen albergar diferentes factores de virulencia y pertenecer a serotipos distintos, por lo que generalmente no suelen producir infecciones cruzadas. No obstante, se ha demostrado que los animales pueden actuar como reservorio de cepas patógenas para el ser humano, como por ejemplo las cepas verotoxigénicas de *E. coli* que causan colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) en personas, pero están presentes como comensales en la microbiota intestinal normal de los rumiantes (Blanco *et al.*, 2003; Sánchez, 2008).

Las cepas patógenas de *E. coli* pueden clasificarse en dos grupos principales: las que originan procesos de tipo entérico, causantes de diarrea, disentería, CH, SUH, enfermedad de los edemas; y las extra-intestinales, que producen infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, e infecciones pulmonares y de heridas (Kaper *et al.*, 2004; Clements *et al.*, 2012). Tradicionalmente, el primer grupo, causante de procesos entéricos, se ha clasificado en distintos subgrupos en función de la patología que provocan (patotipos), de los factores de virulencia presentes (virotipos) y de su filogenia (filotipos) (Vogeleer *et al.*, 2014). Según Clements *et al.* (2012), entre ellos estarían:

- *E. coli* con adherencia invasiva (ECAI).
- *E. coli* con adherencia difusa (ECAD).
- *E. coli* enteroagregativos (ECEA).
- *E. coli* enterotoxigénicos (ECET).
- *E. coli* enteropatogénicos (ECEP).
- *E. coli* enteroinvasivos (ECEI).
- *E. coli* verotoxigénicos (ECVT), que englobarían a su vez a los *E. coli* enterohemorrágicos (ECEH).

Para el segundo grupo de cepas patógenas, las clasificadas como extra-intestinales, no se han descrito unos factores de virulencia concretos que definan cada patotipo como en el caso de las que causan patología entérica, si bien pueden subdividirse también en distintos subgrupos (Kaper *et al.*, 2004; Pitout, 2012):

- *E. coli* uropatogénicos (ECUP).
- *E. coli* septicémicos o bacteriémicos (ECSeP).
- *E. coli* asociadas a la meningitis neonatal (ECMN).
- *E. coli* patogénicos aviares (ECPA).

Además, se han descrito otros potenciales grupos patógenos tales como los *E. coli* necrotóxicos (ECNT) y los *E. coli* con capacidad para desprender células (ECCDC) (Kaper *et al.*, 2004).

Los distintos patotipos de *E. coli* son grupos clonales que se caracterizan por compartir los antígenos O (lipopolisacárido, LPS) y H (flagelar), que definen el serogrupo (si se determina sólo el antígeno O) o el serotipo (si se determinan ambos antígenos) (Whittam, 1996; Nataro and Kaper, 1998). Estos antígenos se identifican empleando tanto técnicas convencionales, como el uso de antisueros específicos (mediante reacciones antígeno-anticuerpo) (Kauffmann, 1947), como técnicas moleculares, ya sea mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o secuenciación del genoma completo (WGS). Algunos serotipos se asocian con mayor frecuencia a determinadas manifestaciones clínicas (Lior, 1994), como sucede con los serotipos O157:H7 y O157:H- y el SUH (EFSA and ECDC, 2012).

1.2. Características de los *E. coli* verotoxigénicos

En este grupo se engloba a todas aquellas cepas de *E. coli* capaces de producir verotoxinas (VT) (Donnenberg and Whittam, 2001), que son potentes citotoxinas que inhiben la síntesis proteica en sus células diana (Hayashi *et al.*, 2008) y que reciben su nombre por ser capaces de destruir *in vitro* las células de la línea Vero (células de riñón de mono verde africano) (Konowalchuk *et al.*, 1977). Las VT son también conocidas como toxinas Shiga (Stx) o toxinas *Shiga-like* (SLT), debido a su similitud con la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo I (O'Brien *et al.*, 1982) que fue descrita mucho antes por distintos investigadores (Conradi, 1903; Neisser and Shiga, 1903). Por ello, los ECVT también se denominan *E. coli* productores de toxinas *Shiga-like* (ECSLT) o *E. coli* productores de toxinas Shiga (STEC). Las Stx son codificadas por los genes *stx*, que se localizan en bacteriófagos integrados en el genoma de los ECVT (Andreoli *et al.*, 2002). Esta integración puede producirse en

Introducción

distintos puntos, por lo que es posible la presencia de varios bacteriófagos cada uno portando un gen *stx*, incluso de subtipos distintos de verotoxina (Krüger and Lucchesi, 2015).

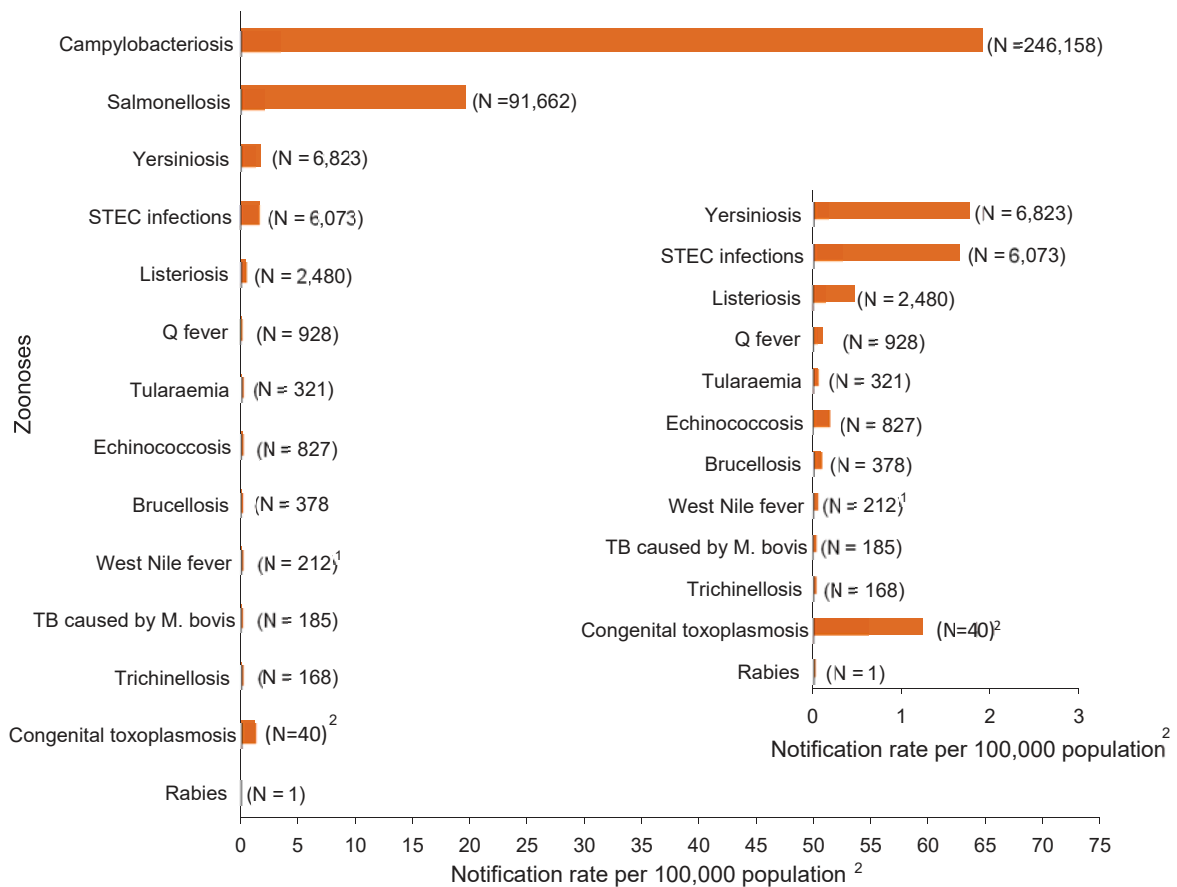
Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, dentro de los ECVT se incluyen los ECEH. Los ECEH, por su parte, integran a distintos serotipos que han sido fehacientemente identificados como causantes de CH y SUH, siendo el serotipo O157:H7 (conocido popularmente como “bacilo O157” o “bacteria de las hamburguesas”) el más frecuentemente asociado a brotes epidémicos (Vogeleer *et al.*, 2014). Sin embargo, se han descrito otros serogrupos distintos a éste, denominados ECEH no-O157, que son también clínicamente relevantes pero que se detectan con distinta frecuencia según el país. Por ejemplo, en Estados Unidos (EE.UU.), son los serogrupos O26, O103, O111, O121, O45 y O145 (ordenados según frecuencia) los que adquieren mayor relevancia. De hecho, estos serogrupos causan juntos más infecciones en seres humanos que el ECVT O157:H7, por lo que son denominados “Big Six” (Mathusa *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). En Europa, en cambio, según datos de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicados en 2017, los serogrupos ECVT no-O157 más frecuentes entre los casos humanos de infección son O26, O103, O91, O145, O146, O111 y O113 (ordenados según frecuencia) (EFSA and ECDC, 2018).

1.3. Situación en Europa de los *E. coli* verotoxigénicos

Desde su identificación como patógeno y agente causal de CH y de SUH a principios de la década de 1980 en EE.UU. (Riley *et al.*, 1983), la prevalencia de ECVT O157:H7 y ECVT en general se ha visto incrementada hasta situarse entre los principales agentes infecciosos responsables de gastroenteritis tanto en la Unión Europea (UE) como en EE.UU. (Slutsker *et al.*, 1997; Andreoli *et al.*, 2002; J. E. Blanco *et al.*, 2004; CDC, 2017; EFSA and ECDC, 2018) gracias a la mejora y generalización de su diagnóstico. Entre los años 2007 y 2013, la incidencia y el número de casos confirmados de infecciones por ECVT en la UE ha ido en aumento (EFSA, 2013; EFSA and ECDC, 2015), estabilizándose entre 2013 y 2017 (EFSA and ECDC, 2018). En la secuencia temporal destaca el año 2011, ya que se produjo un brote causado por un ECEAVT O104:H4 que afectó principalmente a Alemania. En este país se registró el mayor número de casos confirmados de infección, con 9485 casos. Este brote supuso un incremento de casos del 159.4% con respecto al año 2010 (EFSA and ECDC, 2013). En el periodo comprendido entre 2013 y 2017, se confirmaron alrededor de 6000 casos anuales de infección (EFSA and ECDC, 2018).

Según la EFSA y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC), en el año 2017 el cuarto agente zoonótico más importante en cuanto a incidencia fue ECVT (1.66%) con 6073 casos confirmados y, el séptimo en importancia en cuanto a su relación con brotes acaecidos en la UE (EFSA and ECDC, 2015) (**Ilustración 1**). Como se observa en la **Ilustración 2**, aparecen diferencias evidentes en el número de casos registrados y tasas de notificación entre países de la UE, debido a la heterogeneidad de los protocolos de detección (más exhaustivos en algunos países miembros) y a los protocolos de monitorización estatales.

Ilustración 1. Número de casos confirmados y tasas de notificación de zoonosis en la UE en 2017 (EFSA and ECDC, 2018).



Entre paréntesis, y al final de cada barra se indica el número total de casos confirmados. (1) Para la fiebre West Nile se ha usado el número total de casos; (2) Para la toxoplasmosis congénita se ha usado la tasa de notificación por cada 100 000 nacimientos.

Tabla 1. Casos y tasas de notificación por cada 100 000 habitantes de infecciones humanas por ECVT entre 2013 y 2017 en países miembros y asociados a la UE (EFSA and ECDC, 2018).

País	Cob. Nac. ^(a)	Form. Datos ^(a)	2017		2016		2015		2014		2013		
			Cas. Tot. ^(e)	Casos		Casos		Casos		Casos		Casos	
				Confir. y Tasas ^(f)	Confir. y Tasas		Confir. y Tasas		Confir. y Tasas		Confir. y Tasas		
					Cas	Tas	Cas	Tas	Cas	Tas	Cas	Tas	Cas
Austria	Y	C	250	250	2.85	177	2.04	107	1.25	131	1.54	130	1.54
Bélgica	Y	C	123	123	1.08	119	1.05	100	0.89	85	–	117	–
Bulgaria	Y	A	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.01
Croacia	Y	C	7	7	0.17	9	0.21	0	0.00	4	0.09	0	0.00
Chipre	Y	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Rep. Checa	Y	C	37	37	0.35	28	0.27	26	0.25	29	0.28	17	0.16
Dinamarca	Y	C	344	263	4.57	210	3.68	201	3.55	226	4.02	191	3.41
Estonia	Y	C	3	3	0.23	5	0.38	8	0.61	6	0.46	8	0.61
Finlandia	Y	C	124	123	2.24	139	2.53	74	1.35	64	1.17	98	1.81
Francia ^(b)	N	C	303	260	–	302	–	262	–	221	–	218	–
Alemania	Y	C	2098	2065	2.50	1843	2.24	1616	1.99	1663	2.06	1639	2.00
Grecia	Y	C	3	3	0.03	2	0.02	1	0.01	1	0.01	2	0.02
Hungría	Y	C	12	12	0.12	12	0.12	15	0.15	18	0.18	13	0.13
Irlanda	Y	C	804	795	16.62	737	15.60	598	12.92	572	12.42	564	12.29
Italia ^(b)	N	C	111	94	–	78	–	59	–	68	–	64	–
Letonia	Y	C	1	1	0.05	1	0.05	4	0.20	0	0.00	0	0.00
Lituania	Y	C	0	0	0.00	4	0.14	3	0.10	1	0.03	6	0.20
Luxemburgo	Y	C	1	1	0.17	4	0.69	4	0.71	3	0.55	10	1.86
Malta	Y	C	9	9	1.96	4	0.92	4	0.93	5	1.18	2	0.48
Holanda	Y	C	392	392	2.29	665	3.92	858	5.08	919	5.46	1184	7.06
Polonia	Y	C	6	4	0.01	4	0.01	0	0.00	5	0.01	5	0.01
Portugal	Y	C	2	1	0.01	0	0.00	0	0.00	–	–	–	–
Rumania	Y	C	11	11	0.06	29	0.15	0	0.00	2	0.01	6	0.03
Eslovaquia	Y	C	3	3	0.06	2	0.04	1	0.02	2	0.04	7	0.13
Eslovenia	Y	C	33	33	1.60	26	1.31	23	1.11	29	1.41	17	0.83
España ^(c)	N	C	86	86	–	51	–	86	–	50	–	28	–
Suecia	Y	C	504	504	5.04	638	6.48	551	5.65	472	4.89	551	5.77
Reino Unido	Y	C	993	993	1.51	1367	2.09	1328	2.05	1324	2.06	1164	1.82
Total EU	–	–	6260	6073	1.66	6456	1.77	5929	1.65	5900	1.75	6042	1.80
Islandia	Y	C	3	3	0.89	3	0.90	1	0.30	3	0.92	3	0.93

País	Cob. Nac. (a)	Form. Datos (a)	2017		2016		2015		2014		2013				
			Cas. Tot. (e)	Casos Confir. y Tasas (f)		Casos Confir. y Tasas		Casos Confir. y Tasas		Casos Confir. y Tasas		Casos Confir. y Tasas			
				Cas	Tas	Cas	Tas	Cas	Tas	Cas	Tas	Cas	Tas	Cas	Tas
Noruega	Y	C	381	381	7.25	239	4.59	221	4.28	151	2.96	103	2.04		
Suiza (d)	Y	C	696	696	8.23	463	5.47	315	3.77	125	1.52	82	1.53		

(a): Cobertura Nacional. Formato de datos: Y: sí; N: no; A: datos agregados; C: datos basados en casos; -: sin información. (b): Vigilancia centinela; solo se notifican casos con SUH. (c): Vigilancia centinela; no existe información sobre la cobertura, de modo que las tasas no pueden ser estimadas. (d): Suiza aporta los datos directamente a la EFSA. Los datos humanos de Suiza incluyen información de Liechtenstein. (e) Casos totales. (f) Casos confirmados y tasas. Cas: Casos. Tas: Tasas.

Como puede apreciarse en la **Ilustración 1**, al comparar a este grupo de patógenos con otros causantes de toxiinfecciones alimentarias, como *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp., ECVT permanecen en una significativa minoría, de manera que el interés suscitado por este tipo de infecciones se debe principalmente a la gravedad de las complicaciones que suelen llevar asociadas y a su mayor letalidad (Sánchez *et al.*, 2010a). Havelaar *et al.* (2012) estimaron que la carga por caso (en DALY, que es un indicador que estima los años de vida potencialmente perdidos http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/#), es aproximadamente tres veces mayor para la enfermedad causada por ECVT en comparación con la salmonelosis y la campilobacteriosis. Un ejemplo es el ya citado brote de CH y SUH ocurrido en mayo de 2011 y causado por un ECEAVT O104:H4. Durante el brote, y hasta el final de julio de 2011, se produjeron un total de 4321 casos confirmados de infección por este patógeno, con 852 casos de SUH y 54 muertes entre los 14 países de la UE afectados, EE.UU. y Canadá (Buchholz *et al.*, 2011; Karch *et al.*, 2012). En el mismo, un porcentaje inusualmente alto de adultos sobre el total (casi un 25%) desarrolló un SUH, debido probablemente a la fuente de infección (brotes germinados). En algunos casos apareció incluso sintomatología neurológica (Frank *et al.*, 2011b). Esta clínica se debió a la combinación de características típicas de una cepa de ECEA y la capacidad de producir verotoxinas (Frank *et al.*, 2011b). Tras un análisis del genoma completo de este patógeno, se ha concluido que algunos de estos factores de patogenicidad fueron adquiridos mediante transferencia horizontal (Frank *et al.*, 2011a, 2011b).

En cuanto a la presencia de brotes de enfermedad por ECVT asociados al consumo de alimentos en Europa, se notificaron un total de 42 brotes en 2016. En nueve de ellos se logró determinar el alimento implicado, y se trató en todos los casos de carne de bovino o vegetales (EFSA and ECDC, 2017). El número de brotes notificados en 2017 aumentó hasta 48, si bien de nuevo sólo en nueve

Introducción

de ellos se determinó con claridad el alimento implicado (EFSA and ECDC, 2018). Con respecto a la presencia de brotes de enfermedad por ECVT asociados exclusivamente al consumo de agua contaminada, la mayor parte de los casos se han detectado en Irlanda. En 2011 hubo tres casos asociados a ECVT O157, y en 2012 declararon 10 brotes de enfermedad. Un año más tarde, en la UE se notificaron nueve brotes de enfermedad por consumo de aguas contaminadas. Sólo uno de los brotes, detectado en Austria, fue asociado a un ECVT O128. (EFSA and ECDC, 2014, 2015). Finalmente, en 2017, se declararon hasta 11 brotes por consumo de aguas asociados a ECVT, si bien sin evidencias claras (EFSA and ECDC, 2018).

En el periodo comprendido entre 2015 y 2017, los cinco serogrupos de ECVT más frecuentemente asociados a casos humanos de enfermedad fueron O157, O26, O103, O91 y O145, con frecuencias de aparición que varían poco entre los años de estudio (**Tabla 2**). Como puede observarse en la **Tabla 2**, la implicación de las cepas ECVT no-O157 en casos de infección en seres humanos ha ido en aumento en los últimos años, debido sobre todo a una mejora y generalización en los protocolos de detección de estos patógenos.

Tabla 2. Distribución de los 20 serogrupos más frecuentes entre los casos humanos de infección por VTEC confirmados en la UE entre 2015 y 2017 (EFSA and ECDC, 2018).

Serogrupo	2017			2016			2015		
	Casos	MS ^(c)	%	Casos	MS	%	Casos	MS	%
O157	1304	24	31.9	1552	22	38.6	1510	21	42.1
O26	582	18	14.3	671	19	16.7	537	16	15.0
NT^(a)	493	11	12.1	335	12	8.3	397	10	11.1
O103	245	14	6.0	218	18	5.4	172	14	4.8
O91	179	14	4.4	149	11	4.0	114	12	3.2
O145	150	14	3.7	121	12	3.7	95	12	2.6
O146	140	10	3.4	158	11	3.0	75	10	2.1
O111	94	18	2.3	57	14	1.6	42	11	1.2
O113	56	8	1.4	60	11	1.5	25	7	0.7
no-O157	48	4	1.2	25	5	1.4	29	3	0.8
O128	46	12	1.1	65	13	1.0	49	12	1.4
O80	42	7	1.0	42	8	0.8	24	4	0.7
O-rugoso^(b)	37	3	0.9	26	4	0.7	44	8	1.2
O128ab	33	2	0.8	9	1	0.7	2	6	0.1
O76	31	7	0.8	20	6	0.6	31	9	0.9
O121	30	7	0.7	24	5	0.6	17	4	0.5
O55	30	9	0.7	34	10	0.6	28	8	0.8
O63	30	6	0.7	24	4	0.6	8	4	0.2

Serogrupo	2017			2016			2015		
	Casos	MS ^(c)	%	Casos	MS	%	Casos	MS	%
O117	29	4	0.7	28	7	0.6	23	7	0.6
O8	28	7	0.7	25	10	0.5	20	9	0.6
Otros	455	–	11.1	369	–	7.8	348	–	9.7
Total	4082	25	100.0	4012	25	100.0	3590	21	100.0

(a): ECVT no tipable, se refiere a aquellas cepas en las que no se ha podido establecer el serogrupo (O), pese a haberlo intentado. Esto depende de cuántos sueros o marcadores hayan sido incluidos en el panel de tipado. (b): O-rough es la denominación para cepas que carecen de cadenas O en el lipopolisacárido, provocando la auto-aglutinación en los test de aglutinación empleados para determinar el serogrupo o serotipo. (c) Países miembros. Fuente: 25 miembros y 2 no miembros de la UE: Austria, Bélgica, Croacia, Rep. Checa, Dinamarca, Estonia, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Holanda, Polonia, Portugal, Rumania, Eslovaquia, Eslovenia, España, Suecia y Reino Unido, e Islandia y Noruega.

No obstante, como puede verse en las **Ilustraciones 2 y 3**, no todas las cepas que se aíslan en casos de infección por ECVT se serotipan al completo, quedando la identificación a nivel de serogrupo.

Ilustración 2. Casos de infección humana confirmados en la UE ^(a) por serogrupo entre 2007 y 2010 (EFSA, 2013).

2011			2010			2009			2008			2007		
Serogroup	n	% ^(d)	Serogroup	n	% ^(d)	Serogroup	n	% ^(d)	Serogroup	n	% ^(d)	Serogroup	n	% ^(d)
Total typed	4 499	85.0	Total typed	2 413	66.1	Total typed	2 553	71.5	Total typed	2 340	74.1	Total typed	2 062	71.0
O157	2 185	48.5	O157	1 501	62.2	O157	1 848	72.4	O157	1 673	71.5	O157	1 571	76.2
O104	1 064	23.6	O26	257	10.7	O26	192	7.5	O26	166	7.1	O26	136	6.6
O26	287	6.4	O103	90	3.7	O103	82	3.2	O103	88	3.8	O103	77	3.7
O103	141	3.1	O145	61	2.5	O91	48	1.9	O145	49	2.1	O91	43	2.1
O91	116	2.6	O91	57	2.4	O145	47	1.8	O91	50	2.1	O145	31	1.5
O145	76	1.7	O63	42	1.7	O146	31	1.2	O111	43	1.8	O111	23	1.1
O128	53	1.2	O111	41	1.7	O128	26	1.0	O128	28	1.2	O128	21	1.0
O111	52	1.2	O128	29	1.2	O111	25	1.0	O146	25	1.1	O113	16	0.8
O146	48	1.1	O146	28	1.2	O113	22	0.9	O117	20	0.9	O146	14	0.7
Other ^(b)	484	10.7	Other ^b	307	12.7	Other ^b	232	9.1	Other ^b	198	8.5	Other ^b	130	6.3
NT ^(c)	795	15.0	NT ^c	1 238	33.9	NT ^c	1 020	28.5	NT ^c	819	25.9	NT ^c	842	29.0
Grand total	5 301		Grand total	3 651		Grand total	3 573		Grand total	3 159		Grand total	2 904	

(a): Austria, Belgium, Czech Republic (only 2011), Cyprus (only 2008), Denmark, Estonia, Finland (not 2011), France, Germany, Greece (only 2011 and 2010), Hungary (not 2008), Ireland, Italy, Luxembourg, Malta, Poland (not 2009), Romania (only 2011, 2010 and 2008), Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, the Netherlands and the UK.
 (b): Other is other than top nine.
 (c): NT = untyped/untypeable and cases where 'O' antigen was reported as unknown.
 (d): The percentage for the serogroups is using the total typed as denominator.

Ilustración 3. Serotipos más frecuentemente confirmados y notificados en casos de infección en seres humanos entre 2007 y 2010 (basado en datos de TESSy suministrados por el ECDC) y en 2011 (basados en datos de la EFSA y el ECDC) en la UE (EFSA, 2013).

2007-2010			2011		
Serotype	No. of cases	% of cases	Serotype	No. of cases	% of cases
O157:H7	774	36.2	O104:H4 ^(a)	118	17.2
O157: H- ^(b)	273	12.8	O157: H-	117	17.1
O103:H2	131	6.1	O157:H7	114	16.6
O26:H11	107	5.0	O26:H11	39	5.7
O117:H7	55	2.6	O103:H2	30	4.4
O91:H-	44	2.1	O146:H21	16	2.3
O145:H-	33	1.5	O111:H-	14	2.0
O63:H6	31	1.4	O26: H-	13	1.9
O128:H2	30	1.4	O145:H-	9	1.3
O111:H-	29	1.4	O145:H34	8	1.2
O146:H21	27	1.3	O128:H2	7	1.0
O121:H19	23	1.1	O91:H14	5	0.7
O26:H-	20	0.9			
Other	563	26.3	Other	196	28.6
Total	2 140	100	Total	686	100

(a): This serotype O104:H4 was common in 2011 due to the extensive 2011 O104:H4 outbreak.
 (b): H- = the flagellar or 'H' antigen was analysed but was absent.

Introducción

Algunos de estos serotipos se asocian más frecuentemente con SUH y CH. Karmali *et al.* (2003) definieron así el concepto de seropatotipo, como un esquema de clasificación de los serotipos de ECVT basado en la frecuencia de casos de enfermedad notificados (en términos cualitativos como alta, moderada y baja) y su asociación con brotes y casos de enfermedad grave, como SUH y CH. De esta forma, revisando la bibliografía disponible los serotipos fueron clasificados en cinco grandes seropatotipos (de la A a la E) (**Tabla 3**). No obstante, el brote de infección por ECAEVT O104:H4 sucedido en Europa en 2011 ha puesto de manifiesto que dicho esquema presenta limitaciones a la hora de clasificar cepas ECVT emergentes y, desde la EFSA, han sido propuestos nuevos esquemas de clasificación. Uno modificando el esquema propuesto por Karmali *et al.* (2003), que clasifica los serotipos según el resultado de salud de los casos humanos confirmados en la UE entre 2007 y 2010. De este modo, de todos los casos en los que se haya realizado el serotipado completo, aquellos que además hayan sido asociados con enfermedad grave serán considerados dentro del grupo HAS (serotipo asociado a SUH, del inglés: *HUS associated serogroup*). El otro, aunque provisional, se fundamenta en la presencia de factores de virulencia adicionales a las verotoxinas, cuya combinación es más frecuentemente asociada con alto riesgo de diarrea y SUH. En concreto, considera la presencia de otros genes como *eae*, *aaIC* y *aggR*. Este último esquema es provisional porque estos genes mencionados no son identificados de forma rutinaria, aunque tiene la ventaja de que no es necesario conocer el serotipo completo. Para que se afiance, deberá verificarse comparando aislados bien caracterizados de aislados procedentes de origen humano, animal y alimentario (EFSA, 2013). Además, durante el análisis de los esquemas propuestos, se han incluido nuevos serotipos asociados a casos de SUH los serotipos O145:H28, O91:H10, O111:H8, O128:H2, O121:H2, O76:H19, O174:H21, O174:H2, O1:H42, O86:H27, O80:H2, O123:H2, O105:H18, and O7:H6 (EFSA, 2013).

Tabla 3. Clasificación de ECVT en seropatotipos. Tabla basada en el trabajo de Karmali *et al.* (2003).

Seropatotipo	Incidencia relativa	Frecuencia de presentación en brotes	Asociación con enfermedad grave	Serotipos
A	Alta	Común	Si	O157:H7, O157:NM
B	Moderada	Poco común	Si	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 O145:NM
C	Baja	Rara	Si	O91:H21, O104:H21, O113:H21, O5:NM, O121:NM and O165:H25
D	Baja	Rara	No	Múltiples (12 serotipos)
E	No presente en seres humanos	No aplicable	No aplicable	Múltiples (14 serotipos)

En Europa, entre 2007 y 2010, se han asociado con casos de SUH los serotipos O157:H7, O157:H-, O121:H19, O26:H11, O174:H2, O111:H-, O145:H-, O145:H28, O1:H42, O128:H2, O111:H8, O104:H21, O174:H21, O7:H6, O76:H19, O80:H2, O86:H27, O121:H2, O123:H2, O105:H18, O91:H10 (EFSA, 2013). No obstante, conviene destacar que en muchos de los casos de infección por ECVT notificados (11 488 casos entre 2007 y 2010), los aislados obtenidos no fueron serotipados por completo (EFSA, 2013).

En cuanto a las presentaciones clínicas, entre 2007 y 2010, hubo 13 545 casos humanos de enfermedad causados por ECVT confirmados en el laboratorio en toda la UE. Entre ellos, un total de 5405 casos tuvieron algún tipo de manifestación clínica, que en un 65% de los casos fue únicamente diarrea. Entre los que desarrollaron SUH, la diarrea fue principalmente de tipo hemorrágico (**Ilustración 4**). En 2011, el número de casos que desarrollaron SUH se elevó a 1006, de los cuales se estima que más de 700 casos se produjeron durante el desarrollo del brote causado por un ECEAVT O104:H4 que afectó principalmente a Alemania (EFSA, 2013).

Ilustración 4. Presentación clínica de las infecciones por ECVT en seres humanos confirmadas en la UE en el periodo 2007-2010 (basado en datos de TESSy aportados por ECDC) (EFSA, 2013).

Clinical manifestation	HUS ^(b)			Total
	Yes	No	Unknown	
Bloody diarrhoea	180	1 265	737	2 182
Diarrhoea	98	3 536	953	4 587
Asymptomatic	3 ^(c)	323	26	352
Unknown	496	2 019	3 909	6 424
Total	777	7 143	5 625	13 545

(a): Confirmed cases are laboratory confirmed and may or may not fulfil the clinical criteria as described in the case definition.

(b): HUS = haemolytic uraemic syndrome.

(c): Data as reported to ECDC.

En los últimos años, el número de casos de SUH por año ha disminuido. En 2016 se contabilizaron un total de 390 casos de SUH, siendo por primera vez el serogrupo O26 el responsable de la mayoría de los casos (33%). En 2017 se detectaron 429 casos de SUH (un aumento del 10% con respecto al año anterior) con los serogrupos O157 y O26 como responsables del 64% de los casos.

Como ya se ha comentado al inicio de este apartado, existen diferencias entre los países miembros a la hora de monitorizar y aportar la información relativa a estos patógenos y, ya que los datos se basan en una vigilancia pasiva, estos tienden a subestimar la incidencia de las infecciones humanas por ECVT. Por ejemplo, los métodos de detección son diferentes entre los países miembros, identificándose con mayor facilidad los casos causados por ECVT O157 que por ECVT no-

Introducción

O157 en cultivo, gracias al uso de medios con sorbitol, elemento que el ECVT O157 es incapaz de fermentar salvo algunas excepciones. Por todo ello, la EFSA ha estimado la incidencia real en la UE mediante el uso de un factor “multiplicador de enfermedad” (que expresa el grado de subestimación de casos de enfermedad) (**Ilustración 5**). De esta forma, los casos de enfermedad alcanzarían casi 510 000 casos en toda la UE entre 2007 y 2011, apreciándose de forma más acusada las diferencias entre casos por ECVT O157:H7 y no-O157 (EFSA, 2013).

Ilustración 5. Estimación de casos reales de enfermedad por ECVT al año en la UE, basados en la aplicación de factores multiplicadores de enfermedad (EFSA, 2013).

Serotype	Estimated disease-multipliers in EU ^(a)	Notification per year ^(b) , average 2007-2010 (average 2007-2011)	Estimated true incidence data at the EU level ^(c) , average 2007-2010 (average 2007-2011)
VTEC O157	51.2	1 665 (1 768)	85 222 (90 522)
non-O157 VTEC	209.6	713 (1 034)	149 445 (216 684)
VTEC NT ^(d)	209.6	1 009 (966)	211 434 (202 474)
Total VTEC		3 386 (3 768)	446 101 (509 680)

(a): Disease-multipliers for each pathogen based on the estimates published by Scallan et al. (2011) and anchored to the *Salmonella* disease-multiplier estimated at the EU level by Havelaar et al. (2012).

(b): Reported confirmed VTEC cases in humans in EU.

(c): Estimated true number of illnesses in the EU per year calculated by the product of the *Salmonella* based disease-multiplier and the notified number of cases as reported to ECDC database TESSy (The European Surveillance System).

(d): VTEC NT group (untyped/untypeable and cases where ‘O’ antigen was reported as unknown). It is assumed that the disease-multiplier for this group is the same as the one for non-O157 VTEC.

1.4. Situación en España de los *E. coli* verotoxigénicos

En nuestro país, las infecciones por ECVT son relativamente frecuentes. En cuanto a los casos esporádicos de infección, los estudios llevados a cabo por el Laboratorio de Referencia para *E. coli* (LREC) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) entre 1992 y 2011, han puesto de manifiesto que en España las cepas de ECVT constituyen el tercer patógeno bacteriano más frecuentemente aislado de coprocultivos de pacientes con diarrea u otras alteraciones gastrointestinales, después de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. (M. Blanco *et al.*, 2004; Mora *et al.*, 2011).

En los últimos doce años, según datos de la EFSA, se declararon un total de 457 casos humanos de infección confirmados (**Tabla 4**), por lo que España tendría una tasa de infección anual por cada cien mil habitantes de menos de 0.1 casos (EFSA and ECDC, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2017, 2018), si bien este dato proviene de un cálculo poco fiable, ya que el número de casos notificados no corresponde al 100% de la población. No obstante, hasta 2015 esta enfermedad no era de declaración obligatoria, por lo que sólo una pequeña proporción de los casos habría sido analizada en un laboratorio con capacidad diagnóstica (Sánchez *et al.*, 2014b). En 2015 pasó a ser de declaración obligatoria (Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2015-

2837), y desde entonces es obligatorio notificar todos los casos detectados y establecer medidas de control de los mismos. Pese a ello, dado que esta declaración obligatoria no conlleva necesariamente una búsqueda activa, hoy día la incidencia sigue estando infravalorada.

Tabla 4. Casos de infección por cepas de ECVT en seres humanos declarados por España entre 2005 y 2013. Datos basados en los informes de la EFSA y el ECDC (EFSA y ECDC, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015).

	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006	2005
Nº casos	86	51	86	50	28	32	20	18	14	24	19	13	16

Al margen de los datos oficiales de notificación, se han realizado varios estudios epidemiológicos para establecer la prevalencia de infección por ECVT en coprocultivos en nuestro país. Entre 1992 y 2011, el LREC-USC en colaboración con el Hospital Xeral-Calde de Lugo, procesaron un total de 13 962 muestras de heces de pacientes hospitalizados y no hospitalizados de distintas edades que en su mayoría mostraban síntomas de diarrea o gastroenteritis. Del total de muestras analizado, detectaron ECVT en 393 muestras (2.8%), de las cuales 63 (0.5%) fueron positivas a ECVT O157:H7 y 251 (1.8%) positivas a ECVT no-O157, siendo O26:H11 el serotipo no-O157 más frecuentemente identificado (Mora *et al.*, 2011). En otro estudio realizado entre 2005 y 2011, el LREC-USC en colaboración con el Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela analizaron un total de 1479 muestras de heces de pacientes internos y externos de distintas edades que presentaban en su mayoría diarrea hemorrágica. Se detectaron ECVT en 32 (2.2%) muestras, de las que 13 (0.9%) resultaron positivas a ECVT O157:H7, y 16 (1.1%) positivas a ECVT no-O157, siendo O146:H21 el el serotipo no-O157 más frecuentemente identificado (Mora *et al.*, 2011). Nuestro grupo de investigación realizó entre 2006 y 2007 un estudio epidemiológico para detectar ECVT O157:H7 en colaboración con el Servicio de Microbiología del Hospital San Pedro de Alcántara de Cáceres, en el que se procesaron un total de 1675 coprocultivos procedentes de pacientes internos y externos de todas las edades aquejados de procesos gastroentéricos. En el transcurso del estudio se detectó ECVT O157:H7 en 8 coprocultivos, lo que representó una prevalencia del 0.5% (Martínez *et al.*, 2010). Con todo ello, se ha estimado que en España se producen al año alrededor de 500 casos de infección por ECVT O157:H7 y más de 2000 debidos a otros serotipos (Blanco, 2012).

En cuanto a la aparición de brotes de enfermedad en España, según la bibliografía disponible, se ha identificado un total de 10 desde 1986, siete asociados a ECVT O157:H7, uno a ECVT O111:H- y otro a ECVT O26:H11 (**Tabla 5**). Adicionalmente, de acuerdo con los datos del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III), se han identificado otros cuatro brotes más con

Introducción

posterioridad, dos asociados a ECVT O111:H8, uno a ECVT O26:H11 y otro con participación tanto de ECVT O157:H7 como de ECVT O108:H25 (Sánchez *et al.*, n.p.).

Tabla 5. Relación de brotes causados por ECVT en España. Tabla modificada de Sánchez (2008).

Lugar (Referencia)	Año	Circunstancias	Serotipo Perfil toxigénico Fagotipo	Nº afectados
Ibiza (Smith <i>et al.</i> , 1987)	1986	Turistas británicos en un hotel	O157:H7 Stx2	3 (+3 asintomáticos)
Islas Baleares (Willshaw <i>et al.</i> , 1996)	1994	Turistas británicos	O157:H7 Stx2 Fagotipo 2	6 (1 con SUH)
Álava (Blanco <i>et al.</i> , 1996)	1995	Chicos en una casa de campo	O111:H- Stx1	13
Fuerteventura (Pebody <i>et al.</i> , 1999)	1997	Turistas europeos en 4 hoteles	O157:H7 Stx2 Fagotipo 2	14 (3 con SUH)
Guipúzcoa (Gomariz <i>et al.</i> , 2000)	1999	Niños en una guardería	O157:H7	8 (1 con SUH) (+6 asintomáticos)
Guipúzcoa (Gomariz <i>et al.</i> , 2000)	1999	NP	O157:H7	2 (1 con SUH) (+2 asintomáticos)
Barcelona (Anónimo, 2001; Muniesa <i>et al.</i> , 2003)	2000	Niños en 3 colegios	O157:H7 Stx2 Fagotipo 2	175 (6 con SUH)
Lugo (Mora <i>et al.</i> , 2004)	2003	Brote familiar	O157:H7 Stx1 Stx2 Fagotipo 8	3
Lugo (Mora <i>et al.</i> , 2004)	2003	Brote familiar	O26:H11 Stx1	4
Cáceres (Martínez <i>et al.</i> , 2010)	2007	NP	O157:H7 Stx1 Stx2 Fagotipo 14	3
Navarra (Sánchez <i>et al.</i> , n.p.)	2012	Brote familiar	O111:H8 Stx1 Stx2	2 (1 con SUH)
Málaga (Sánchez <i>et al.</i> , n.p.)	2013	Brote familiar	O26:H11 Stx1 Stx2	2 (2 con SUH) (+1 asintomático)
San Fernando (Cádiz) (Sánchez <i>et al.</i> , n.p.)	2014	Niños sin relación aparente	O111:H8 Stx1 Stx2	8 (5 con SUH)
Chiclana de la Frontera (Cádiz) (Sánchez <i>et al.</i> , n.p.)	2015	Miembros de 2 familias sin relación aparente	O157:H7 Stx2 Fagotipo 2 O108:H25 Stx1	6 (2 con SUH) (+2 asintomáticos)

NP: dato no publicado; Stx: toxinas Shiga; SUH: síndrome urémico hemolítico

En España se identifican los mismos serotipos causantes de enfermedad en seres humanos que los ya descritos en el apartado anterior para la UE. Los serotipos con cierta relevancia (tal y como ya se ha expuesto en la **Tabla 5**) son O157:H7 y O26:H11, si bien otros han sido repetidamente aislados en diversos estudios como: O5:H-, O103:H2, O11:H-, O113:H2, O118:H6, O145:H-, O146:H21, O128:H2 y O76:H19 (Mora *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2012, 2014a, 2019).

1.5. Factores de virulencia de *E. coli* verotoxigénicos

Las técnicas de análisis genómico han demostrado que el ADN bacteriano es altamente variable y dinámico (Schmidt and Hensel, 2004). Estos cambios pueden deberse a mutaciones puntuales y conversión de genes, reorganizaciones (inversiones o traslocaciones), deleciones e inserciones de ADN externo (integración de plásmidos, transducciones o transposiciones) (Schmidt and Hensel, 2004). De hecho, incluso dentro de una misma especie pueden observarse variaciones importantes en el tamaño del genoma entre cepas (Hayashi *et al.*, 2008). Por ejemplo, la secuenciación ha permitido comparar los genomas de las cepas O157:H7 Sakai y EDL933 y la cepa K-12 (no patógena), observándose que el cromosoma de las cepas O157:H7 tiene un tamaño aproximado de 5.5 Mb, unas 860 kb más grandes que el de K-12 (Blattner *et al.*, 1997). También se ha demostrado en estas cepas la presencia de 4.1 Mb de secuencias cromosómicas altamente conservadas, siendo el resto del genoma (1.4 Mb en el caso de O157, y 0.5 Mb en el caso de K-12) secuencias específicas de cada cepa. En cuanto a genes se refiere, se han comparado genomas completos de cepas comensales de *E. coli* con cepas de diferentes patotipos (incluyendo ECVT) concluyendo que muchos de los genes presentes en los *E. coli* patógenos analizados están también presentes en las cepas comensales (Rasko *et al.*, 2008). Se estima que *E. coli* tiene aproximadamente 5000 genes, de los cuales entre 2000 y 3000 aproximadamente se corresponden con el genoma altamente conservado (*core genome* en inglés) (Rasko *et al.*, 2008). Aunque se describen genes conservados específicos de cada patotipo, sólo el genoma de ECVT los contiene en una proporción significativa (más de 120 genes). Además, el 43% de estos genes está asociado a profagos, confirmando el papel significativo de los mismos en la evolución de este patotipo (Rasko *et al.*, 2008). Desde el punto de vista de la virulencia, la capacidad más relevante que caracteriza a las ECVT es la producción de toxinas Shiga (Stx), verotoxinas (VT) o toxinas Shiga-like (SLT). No obstante, las cepas ECVT se diferencian tanto de otros patotipos como de otras cepas comensales de *E. coli* no sólo por la presencia de los genes que codifican las verotoxinas (genes *stx*), sino por una extensa maquinaria de determinantes genéticos accesorios asociados a su virulencia, incluyendo aquéllos que codifican factores que intervienen en la colonización o en la producción de otras toxinas e inmunomoduladores (Morabito *et al.*, 2003; Tozzoli *et al.*, 2005; Imamovic *et al.*, 2010).

Introducción

Algunos genes de virulencia se localizan en elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones, bacteriófagos, elementos de inserción e islas genómicas de patogenicidad (Milkman, 1999; Hacker and Carniel, 2001; Hayashi *et al.*, 2008). El ejemplo más claro son los genes *stx*, que se localizan en bacteriófagos capaces de integrarse en el genoma bacteriano y permanecer de forma latente en él por tiempo indefinido (lisogenia), transmitiendo de esta forma a la bacteria la capacidad toxigenica (Andreoli *et al.*, 2002).

1.5.1. Factores de virulencia codificados en el cromosoma bacteriano: isla de patogenicidad LEE, intimina y otras islas de patogenicidad

La isla de patogenicidad denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) es una región cromosómica de entre 35 y 45 Kb compuesta por varios genes implicados en la adherencia íntima a las células del epitelio intestinal (McDaniel *et al.*, 1995; Perna *et al.*, 1998; Mainil and Daube, 2005), el inicio de las vías de transducción de señales con la célula hospedadora y el desarrollo de la lesión histopatológica conocida como *attaching and effacing* (A/E) que aparece durante la colonización del epitelio intestinal por parte de muchos ECVT (Nataro and Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004). En el caso concreto de la cepa ECVT O157:H7 EDL933, la isla de patogenicidad presenta un tamaño de 43 359 pb, contiene 54 marcos abiertos de lectura de los cuales 41 son genes altamente conservados y similares a los de otras cepas EPEC, mientras los 13 genes restantes pertenecen al profago 933L que va insertado en uno de los extremos de LEE (Perna *et al.*, 1998). Además, se ha observado que la composición de bases y el uso de los codones en LEE no son similares a los del resto del cromosoma de *E. coli*, lo que sugiere que este elemento ha sido transferido horizontalmente procedente de otras especies bacterianas (Perna *et al.*, 1998).

La expresión de la isla de patogenicidad LEE se considera necesaria y suficiente para el desarrollo de la lesión A/E (McDaniel and Kaper, 1997; Mainil and Daube, 2005), y las cepas ECVT que la presentan desarrollan una adhesión íntima a la membrana de la célula del epitelio intestinal, provocando posteriormente un borrado o destrucción de las microvellosidades (Sánchez, 2008). Durante el desarrollo de la lesión aparecen cambios estructurales en el citoesqueleto de la célula afectada, en la que se acumula actina polimerizada entre otros componentes (Knutton *et al.*, 1989), justo por debajo de la bacteria adherida, dando origen a la estructura típica en forma de pedestal (Caron *et al.*, 2006).

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que las cepas de ECVT que presentan la isla LEE están asociadas con casos de enfermedad grave en seres humanos (Boerlin *et al.*, 1999). Dicha isla, aparte de gobernar el mecanismo de adhesión mediante A/E, está constituida por tres diferentes módulos: uno que codifica el sistema de secreción tipo III; otro que codifica las proteínas EspA, B y D, que forman parte también del sistema secreción tipo III; y otro que codifica la adhesina intimina o Eae y el receptor translocado de intimina o Tir, que es transportado al citoplasma de la célula hospedadora por el sistema de secreción tipo III (Delahay *et al.*, 2001).

La intimina es una proteína de membrana externa de 94-97 KDa, codificada por el gen *eae* (*E. coli attaching and effacing*), que actúa como factor de adherencia para fijar la bacteria a la célula epitelial. Se trata de una proteína con dos zonas muy diferenciadas, una altamente conservada entre cepas de un mismo serotipo, en la región N-terminal, y otra muy variable, en la región C-terminal (con 280 aminoácidos) cuyos cambios en la secuencia aminoacídica originan variaciones antigénicas (Caprioli *et al.*, 2005). Son estas variaciones las que originan distintos tipos de intimina (al menos hasta 21 tipos y subtipos) distinguibles mediante PCR: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\xi R/\beta 2B$, $\delta/\beta 2O$, κ , $\gamma 1$, $\gamma 2$, θ , $\epsilon 1$, $\nu R/\epsilon 2$, ζ , $\eta 1$, $\eta 2$, $\iota 1$, $\mu R/\iota 2$, λ , μB , νB , ξB y \omicron (Mora *et al.*, 2007). Algunos tipos y subtipos de intimina se asocian con los serotipos más frecuentemente implicados en brotes de CH y SUH. Este es el caso de $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$ y $\beta 1$ en O157:H7, O145:H28, O111:H8 y O26:H11 (Blanco *et al.*, 2005; Caprioli *et al.*, 2005; Sánchez, 2008).

La isla de patogenicidad LEE está presente en las cepas del ECVT O157:H7 y en muchas otras no-O157 asociadas con enfermedad en el hombre (Kaper *et al.*, 1998). No obstante, algunas cepas de ECVT no-O157 no presentan dicha isla y sin embargo han sido relacionadas con brotes o casos esporádicos de enfermedad (Kaper *et al.*, 2004), lo que demuestra que aunque importante, su presencia no es estrictamente necesaria para que exista patogenicidad. En esta línea, se han descrito otras islas de patogenicidad como las denominadas *Locus of Adhesion and Autoaggregation* (LAA) (Montero *et al.*, 2017) y *Subtilase-Encoding* (SE) (Michelacci *et al.*, 2013), presentes exclusivamente en cepas ECVT sin la isla de patogenicidad LEE y otros mecanismos de adhesión alternativos.

La isla de patogenicidad LAA, de 86 kb, se compone de cuatro módulos que codifican 80 genes, incluyendo a factores de virulencia como la hemaglutinina de *E. coli* productores de toxina Shiga (Hes), la adhesina homóloga a la proteína de adquisición de hierro A (Iha) y la proteína autotransportadora Ag43. Debido a esta composición modular, puede estar presente en forma de estructura completa (con los cuatro módulos) o incompleta (con uno, dos o tres módulos) en

Introducción

diferentes cepas (Montero *et al.*, 2017). Cabe destacar que sólo las cepas cuya estructura de la isla de patogenicidad LAA está completa han sido asociadas con casos de enfermedad y que ha sido propuesta como marcador para la identificación de cepas patógenas de ECVT sin la isla de patogenicidad LEE (Montero *et al.*, 2017).

La isla de patogenicidad SE, de 8 kb, contiene genes que codifican la citotoxina subtilasa (concretamente el subtipo SubAB₂), un factor de invasión toxigénico (Tia) y una proteína con capacidad para modular la respuesta inflamatoria (ShiA) (Michelacci *et al.*, 2013). SubAB₂ es una proteína de la familia de las citoxinas AB₅, constituida por una subunidad A (35 KDa) con actividad serina proteasa y cinco subunidades B que forman un pentámero que media la unión a receptores de la superficie celular (Byres *et al.*, 2008). Por su parte, Tia es una proteína de 25 kDa cuya actividad permite la adhesión e invasión de células (Fleckenstein *et al.*, 1996), mientras que ShiA es una proteína de estructura similar a la descrita en cepas del género *Shigella*, con capacidad para modular la respuesta inflamatoria producida por este patógeno (Ingersoll *et al.*, 2003).

1.5.2. Factores de virulencia codificados en plásmidos

Las cepas de ECVT, en particular los ECEH, portan grandes plásmidos como el pO157 (90 kb), que contienen genes de virulencia, como el que codifica la enterohemolisina (E-Hly) (Caprioli *et al.*, 2005), una proteína de membrana externa capaz de lisar los eritrocitos (Beutin *et al.*, 1990). Otros genes presentes codifican proteínas con actividad catalasa-peroxidasa (KatP) y serina proteasas (EspP) (Schmidt *et al.*, 2001) y la proteína ToxB, homóloga a las descritas en algunos clostridios, cuya presencia se ha asociado con la capacidad de adhesión a células en cultivos (Tatsuno *et al.*, 2001), a la inhibición de la activación de linfocitos del hospedador (Klapproth *et al.*, 2000) y a la modulación de la expresión y secreción de otras proteínas de la isla de patogenicidad LEE (Tatsuno *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2004).

Otro plásmido que contribuye a la patogenicidad de ECVT es el pO113, descrito por primera vez en una cepa del serotipo O113:H21 causante de un brote de SUH (Newton *et al.*, 2009). Es de mayor tamaño que el pO157, con 165 kb, y tiene muchos genes de virulencia en común, como el que codifica la proteína EspP, si bien no posee otros como el que codifica el homólogo de la proteína ToxB. Además, presenta otros factores de virulencia como la proteína auto-transportadora EpeA y la adhesina autoaglutinante Saa, así como la ya descrita subtilasa (en este caso, el subtipo plasmídico SubAB₁) (Newton *et al.*, 2009).

1.5.3. Factores de virulencia codificados por bacteriófagos: toxinas Shiga

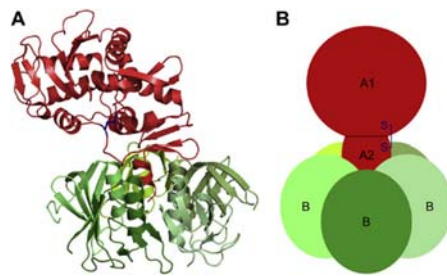
Las toxinas Shiga (Stx), verotoxinas (VT) o toxinas Shiga-like (SLT) son el principal factor de virulencia en las infecciones producidas por ECVT (Gyles, 2007). Con respecto a su estructura, las toxinas Shiga pertenecen a la familia de las proteínas tóxicas AB₅ (≈ 70 KDa) (Melton-Celsa, 2014), que están compuestas por dos subunidades: la A (32 KDa y entre 293 y 297 aminoácidos), con actividad catalítica y responsable de la interrupción de funciones esenciales en el hospedador, y la B (7.7 KDa y entre 69 y 71 aminoácidos), que se encuentra en forma pentamérica y que permite la unión a receptores específicos de glucanos presentes en la superficie de la célula diana (Beddoe *et al.*, 2010; Melton-Celsa, 2014) (**Ilustración 6**).

La subunidad A es un polipéptido compuesto por dos dominios: A1 (28 KDa) y A2 (4 KDa), que están unidos mediante un enlace disulfuro. El dominio A1 contiene el dominio catalítico responsable de la toxicidad para la célula hospedadora, mientras que el dominio A2, que consiste en una alfa-hélice, penetra en el poro central de la subunidad pentamérica B para originar el anclaje entre ambas subunidades que componen la holotoxina (Beddoe *et al.*, 2010). El efecto tóxico de la subunidad A de las toxinas Shiga se basa en su actividad ARN N-glicosidasa que inhibe la síntesis proteica de las células eucariotas mediante la escisión de una base adenina específica de la subunidad 28S del ARN ribosomal, causando la muerte celular (Beddoe *et al.*, 2010; Melton-Celsa, 2014).

La subunidad pentamérica B se une al receptor globotriaosilceramida (Gb3), que es un glicoesfingolípido presente en las membranas de una gran cantidad de tipos celulares eucariotas (Melton-Celsa, 2014). Además de con este receptor, ciertas variantes de las Stx, como Stx1a y Stx2a, interaccionan débilmente con la globotetraosilceramida (Gb4) (Nakajima *et al.*, 2001), mientras que la variante Stx2e se une preferentemente a Gb4 (DeGrandis *et al.*, 1989; Samuel *et al.*, 1990).

Introducción

Ilustración 6. Estructura de la toxina Shiga determinada por cristalografía de rayos X (Fraser *et al.*, 1994) (PDB ID: 1DM0). Subunidad A en rojo, subunidades B en verde y puente disulfuro en azul. Original de Bergan *et al.* (2012).



La familia de las Stx se divide en varios tipos y subtipos de toxinas según su secuencia aminoacídica y su reactividad inmunológica. Una misma cepa de ECVT puede expresar uno o varios tipos de toxina, y distintos subtipos de una misma toxina (Karch *et al.*, 2005; Scheutz *et al.*, 2012).

Ante la existencia de diferentes nomenclaturas para estas toxinas en la bibliografía, en 2012, Scheutz *et al.* las clasificaron según su filogenia y propusieron una nomenclatura común. En concreto se han definido dos tipos de toxina, Stx/Stx1 y Stx2, cada uno de los cuales se divide a su vez en subtipos. Para Stx/Stx1 se han definido tres: Stx de *S. dysenteriae* tipo 1 junto con Stx1a (prácticamente idénticas), Stx1c y Stx1d. Para Stx2 se han definido al menos siete: Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g. Las distintas variantes poseen distinta actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo* y se asocian a enfermedad con distinta frecuencia. Concretamente, la toxina Stx2 se relaciona con los casos más graves de enfermedad (SUH) (EFSA, 2013). Por ejemplo, los subtipos Stx1c y Stx1d son raramente detectados en casos humanos de enfermedad y, cuando lo son, suelen ser casos leves (Friedrich *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2012), siendo más común encontrarlos en aislados de origen ovino (W. Zhang *et al.*, 2002). Por el contrario, el subtipo Stx2a es frecuentemente detectado en seres humanos enfermos, al igual que Stx2c y Stx2d, que han sido asociadas con los casos más graves de enfermedad (SUH) (Friedrich *et al.*, 2002; Bielaszewska *et al.*, 2006; Bosilevac and Koohmaraie, 2011). Esta última variante muestra una alta citotoxicidad para células Vero en presencia de la elastasa del mucus intestinal, por lo que es considerada altamente virulenta (Kokai-Kun *et al.*, 2000) siendo descrita en seres humanos enfermos (Bielaszewska *et al.*, 2006; Mariani-Kurkdjian *et al.*, 2014; Delannoy *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2017). Por otro lado, la variante Stx2e es producida principalmente por los serotipos de ECVT asociados con la enfermedad de los edemas en los cerdos (Marques *et al.*, 1987; Moxley, 2000) y no tiene repercusión clínica en infecciones humanas. En cuanto al subtipo Stx2f, si bien se ha descrito tradicionalmente en cepas ECVT aisladas de palomas, cada vez se detecta con más frecuencia en cepas aisladas de casos humanos de diarrea, y se ha vinculado incluso con algunos casos de SUH (Friesema *et al.*, 2014; Grande *et al.*, 2016).

El mecanismo de acción de estas toxinas se fundamenta, como ya se ha mencionado con anterioridad, en su capacidad para inhibir la síntesis proteica en la célula diana. Sin embargo, la forma en que la toxina traspasa la barrera intestinal no es conocida, contemplándose diferentes modelos (Schüller, 2011). Uno de los mecanismos propuestos se basa en la interacción entre las subunidades B y los receptores Gb3 (Schüller, 2011) que activan el traslado mediante endocitosis de este complejo al interior de la célula. La toxicidad de Stx está correlacionada con la cantidad de receptores Gb3 expresados en la membrana celular, la densidad de estos receptores, la presencia de subtipos distintos de Gb3 y su asociación a lípidos como el colesterol (Schüller, 2011). Según estos elementos, se pueden clasificar las células en resistentes o sensibles a las toxinas Stx. En células resistentes, las vesículas que se originan pueden fusionarse con lisosomas, lo que termina con la destrucción de las toxinas (Law, 2000; Hoey *et al.*, 2003). Sin embargo, en células susceptibles, dichas vesículas acaban en el citosol mediante un transporte retrógrado hacia el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático (ER) y la membrana nuclear (Sandvig *et al.*, 1992). En el ER se separa la subunidad A1, que es retro-translocada al citoplasma, donde se une a la subunidad 28S del ribosoma e inhibe la síntesis proteica (Hoey *et al.*, 2003). Además de estos mecanismos propuestos, dado que la infección por ECVT va acompañada de inflamación y daño en la mucosa intestinal, es posible que las toxinas atraviesen directamente la barrera a través del epitelio dañado en las fases más tardías de la infección (Schüller, 2011).

Los genes *stx* se localizan en bacteriófagos atemperados de tipo lamboide pertenecientes a la familia *Siphoviridae*, *Myoviridae* o *Podoviridae* (Rooks *et al.*, 2012) que, a su vez, se integran en el genoma de la bacteria (Andreoli *et al.*, 2002). Estos bacteriófagos son responsables de la adquisición de la capacidad toxigenica de las cepas de *E. coli* que antes no tenían, y contribuyen al progreso de la infección, ya que cuando se induce el ciclo lítico del fago se expresan los genes *stx* y, por tanto, se produce y libera la toxina. Además, provocan la muerte de la bacteria y la liberación de muchos fagos con el gen *stx* capaces de infectar otras bacterias (Herold *et al.*, 2004). El tamaño de estos bacteriófagos varía entre 29.7 y 68.7 Kb (Krüger and Lucchesi, 2015) y, si bien todos presentan una estructura genómica similar, existe una gran diversidad de secuencias incluso en bacteriófagos que portan el mismo subtipo de *stx* (Smith *et al.*, 2012; Steyert *et al.*, 2012; Tozzoli *et al.*, 2014). También presentan diferencias en cuanto a la morfología de la cabeza (de hexágono regular o alargada) y la cola (corta o larga) (Muniesa *et al.*, 2004b; Karama and Gyles, 2008), así como una gran heterogeneidad en su rango de infección de bacterias hospedadoras (Gamage *et al.*, 2003; Muniesa *et al.*, 2004a).

Introducción

Los bacteriófagos presentan un ciclo con dos estados claramente diferenciados: el estado lisogénico (fase de latencia), en el que el bacteriófago se encuentra integrado en el genoma de la bacteria y la expresión de muchos de sus genes (incluyendo el gen *stx*) está inhibida; y el estado lítico, donde la represión es anulada, los genes se expresan de forma masiva y se produce la liberación de grandes cantidades de bacteriófagos, con genes *stx* integrados y con capacidad infectiva para otras células tras la lisis bacteriana (Wagner *et al.*, 2001; Gamage *et al.*, 2003; Krüger and Lucchesi, 2015). El cambio de un estado a otro se denomina inducción y, si bien a veces se produce de forma espontánea (Krüger and Lucchesi, 2015), puede aparecer como consecuencia de determinados estímulos o factores, tales como el peróxido de hidrógeno (Wagner *et al.*, 2001), la temperatura elevada y luz ultravioleta (Yue *et al.*, 2012), el cloruro de sodio (Harris *et al.*, 2012), el óxido nítrico (Vareille *et al.*, 2007) o antibióticos como las quinolonas (Kimmitt *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Gamage *et al.*, 2004; Bielaszewska *et al.*, 2012).

La integración de los bacteriófagos en el genoma puede producirse en distintos puntos, existiendo una gran diversidad de sitios de inserción entre las cepas ECVT no-O157 (Krüger and Lucchesi, 2015). Por tanto, es posible la presencia de varios bacteriófagos (cada uno portando un gen *stx*) en la misma célula hospedadora, de hecho, se han descrito hasta tres subtipos distintos de genes *stx* en una misma cepa (Bertin *et al.*, 2001; Eklund *et al.*, 2002; Krüger *et al.*, 2011).

Los bacteriófagos no sólo tienen un papel en la presencia y producción de las toxinas Stx, sino que también pueden regular algunos pasos de la interacción que se produce entre las cepas ECVT y el epitelio intestinal del hospedador, aportando ventajas selectivas para la colonización y la persistencia de estas cepas (Krüger and Lucchesi, 2015), como por ejemplo regulando la expresión del sistema de secreción tipo III (Tozzoli *et al.*, 2014).

Distintos trabajos han detectado y aislado bacteriófagos de vida libre en diferentes ambientes como heces bovinas y aguas fluviales y residuales (Muniesa *et al.*, 2004b; Oot *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2010), presentando una alta persistencia en el medio ambiente y capacidad para resistir frente a desinfectantes (Muniesa *et al.*, 1999; Kajjura *et al.*, 2001; Rode *et al.*, 2011). Por todo ello, la difusión de los mismos no sólo se produce en el intestino, sino que es posible en otros entornos como agua y alimentos (Imamovic *et al.*, 2009; Picozzi *et al.*, 2012), lo que los convierte en reservorios de bacteriófagos *stx* que pueden facilitar la persistencia y emergencia de nuevas cepas de ECVT.

1.6. Presentaciones clínicas de la infección por *E. coli* verotoxigénicos

El interés de las infecciones por ECVT se debe, como ya se ha mencionado, no tanto a su prevalencia como a la gravedad de las complicaciones que originan y a su mayor letalidad (Sánchez *et al.*, 2010a). En este sentido, las infecciones humanas producidas por este tipo de patógenos, pueden provocar desde diarrea no sanguinolenta hasta CH, SUH o púrpura trombocitopénica trombótica (PPT).

En su presentación más habitual la infección cursa con CH, caracterizada por dolor abdominal y diarrea sanguinolenta, generalmente sin fiebre. Hasta un 15% de los pacientes que comienzan con esta sintomatología termina desarrollando SUH (Tarr *et al.*, 2005).

El SUH afecta sobre todo a niños, siendo considerado una de las causas más comunes de fallo renal agudo (Andreoli *et al.*, 2002), si bien en algunos brotes se ha observado una alta proporción de pacientes adultos afectados (Frank *et al.*, 2011b). Se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo, que puede requerir diálisis e incluso trasplante renal, con mortalidades de hasta el 10% y graves secuelas en hasta en el 30% de los afectados (Karmali, 1989; Slutsker *et al.*, 1997; Nataro and Kaper, 1998; Andreoli *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2006). En pacientes adultos puede aparecer PTT posdiarreica que cursa con fiebre con mayor frecuencia que el SUH, además de marcados síntomas neurológicos (Paton and Paton, 1998).

1.7. Reservorio animal de *E. coli* verotoxigénicos

Las cepas de ECVT pueden encontrarse en el intestino de múltiples especies animales domésticas y salvajes (Caprioli *et al.*, 2005; Persad and LeJeune, 2014). Muchas de estas especies carecen de receptores específicos para las verotoxinas, por lo que no sufren enfermedad, aunque pueden mantener las bacterias de forma continua o intermitente en el tracto gastrointestinal (Persad and LeJeune, 2014) y eliminarlas al medio junto con las heces.

Cabe por tanto distinguir entre reservorios, que son especies capaces de mantener ECVT en ausencia de exposición continua o que están continuamente expuestos a partir de fuentes de contagio ambientales y, hospedadores por desbordamiento, que son especies susceptibles de ser colonizadas por cepas de ECVT y transmitir las, pero no de mantenerlas en su tracto intestinal durante largos periodos (Persad and LeJeune, 2014).

Introducción

El ganado bovino está considerado el principal reservorio de ECVT O157 y la principal fuente de infección para el hombre, ya que este patógeno forma parte de la microbiota intestinal normal del ganado bovino, que lo excreta de forma asintomática (Caprioli *et al.*, 2005). En la misma línea, los pequeños rumiantes, como el ganado ovino y caprino, son importantes reservorios de ECVT (Blanco *et al.*, 2003; Orden *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2003; Cortés *et al.*, 2005; Sánchez, 2008), incluyendo cepas altamente patógenas para seres humanos. También se ha descrito la presencia de ECVT en leche y otros productos lácteos procedentes de estos rumiantes (Rey *et al.*, 2006). Así mismo, otras especies de rumiantes como búfalo de agua, ciervo y bisonte, también han sido identificadas como excretoras de ECVT e implicadas en brotes de enfermedad en seres humanos (Caprioli *et al.*, 2005; Persad and LeJeune, 2014). Concretamente en el caso del ciervo, se han detectado ECVT en las heces de distintas especies (Renter *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2009a; Bardiau *et al.*, 2010), así como en canales, carne y productos cárnicos (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012; Sauvala *et al.*, 2019) y se han descrito brotes asociados al consumo de carne de ciervos y/o manipulación de canales sin las medidas higiénicas apropiadas (Keene *et al.*, 1997; Rounds *et al.*, 2012; McElhiney *et al.*, 2018)

Otras especies como cerdo, jabalí, conejo, perro, gato y caballo, así como distintas aves y roedores e insectos pueden ser consideradas como hospedadores por desbordamiento (Persad and LeJeune, 2014). En estas especies se han detectado ECVT con distinta prevalencia y han sido asociadas puntualmente con casos humanos de enfermedad (Jay *et al.*, 2007; Trotz-Williams *et al.*, 2012).

Finalmente, los seres humanos pueden ser reservorios de ECVT, desempeñando un papel clave en su epidemiología como consecuencia de la existencia de portadores asintomáticos (Karch *et al.*, 2005; Beutin and Martin, 2012). La contaminación ambiental y de alimentos con ECVT como resultado de la excreción a partir de manipuladores de alimentos asintomáticos, así como la transmisión de persona a persona, son la causa de muchos brotes y casos esporádicos de enfermedad de origen desconocido (Persad and LeJeune, 2014) y que afectan sobre todo a la población especialmente susceptible (niños y ancianos).

1.8. Técnicas de subtipificación de *E. coli* verotoxigénicos

1.8.1. Electroforesis en campo pulsante

La electroforesis en campo pulsante (PFGE) es la técnica de referencia o “*gold standard*” empleada para la subtipificación genotípica de cepas ECVT, así como otros patógenos bacterianos transmitidos a través de los alimentos y otras bacterias (Barrett *et al.*, 1994; Streulens *et al.*, 2001; Swaminathan *et al.*, 2001; Goering, 2004). Es la técnica, junto con la WGS, que ha mostrado mejores resultados para establecer las relaciones clonales entre aislados relacionados epidemiológicamente, dado su elevado poder de discriminación y reproducibilidad (Sánchez, 2008).

Fue empleada por primera vez para la subtipificación genotípica del ECVT O157:H7 por Böhm and Karch (1992) y se fundamenta en la técnica del análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Se resuelve mediante una electroforesis, que va alternando progresivamente la dirección del campo eléctrico de forma que permita la separación de fragmentos de ADN de gran tamaño. Separa hasta 20 y 25 fragmentos del cromosoma bacteriano de 20 a 800 kb (Lukinmaa *et al.*, 2004; van Belkum *et al.*, 2007) generados tras la digestión con una enzima de restricción, de corte poco frecuente, una vez que ésta ha reconocido una secuencia específica. La comparación de estos patrones permite establecer la similitud entre dos o más aislados, considerando que los patrones indistinguibles o con alta similitud son indicativos de un origen común de los aislados.

Existen desde hace años protocolos estandarizados para la realización de la técnica en ECVT, como el propuesto por PulseNet International (www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf). Esta entidad es una red internacional de laboratorios nacionales y regionales dedicada a la vigilancia de infecciones transmitidas por alimentos en todo el mundo. Estos protocolos tienen por objeto que los resultados de la técnica puedan ser comparados entre laboratorios bajo unos estándares de calidad (Fisher and Threlfall, 2005; Gerner-Smidt *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2006; Swaminathan *et al.*, 2006; Terajima *et al.*, 2006). En dicho protocolo, la enzima de restricción de elección es *Xba*I, pudiendo emplearse como segunda enzima *Bln*I/*Avr*II para incrementar el poder de discriminación en caso de obtener perfiles indistinguibles con *Xba*I (Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2006; Arthur *et al.*, 2007; Pei *et al.*, 2008).

Introducción

Los criterios para la interpretación de los resultados de esta técnica fueron establecidos por Tenover *et al.* (1995) y revisados posteriormente por Barret *et al.* (2006), aunque no son específicos para ECVT sino recomendaciones generales para la interpretación de la técnica en distintas especies bacterianas. Barret *et al.* (2006) recomiendan tener en cuenta distintos factores a la hora de interpretar los resultados, como son la calidad del gel, la prevalencia y la variabilidad del organismo sometido a estudio, que puede observarse incluso entre serotipos. Otro factor relevante es el tiempo transcurrido en caso de brotes prolongados con transmisión continuada, ya que a mayor duración hay mayor probabilidad de que aparezcan diferencias entre perfiles de aislados relacionados. Finalmente, estos autores recomiendan interpretar siempre los resultados dentro de un contexto epidemiológico, ya que los resultados de PFGE por sí mismos no permiten establecer una relación entre aislados. Teniendo en cuenta los mencionados factores, estos autores recomiendan considerar como “diferentes” aquellos perfiles de PFGE entre los que se observe cualquier diferencia. Igualmente, consideran que debe aceptarse más variabilidad (diferencias en el perfil de PFGE de hasta dos y tres fragmentos de restricción) si la duración del brote es sostenida en el tiempo, e incluso, considerar como pertenecientes a una misma cepa perfiles de PFGE con mayor número de fragmentos de restricción de diferencia, si la información epidemiológica disponible es lo suficientemente fuerte. Estas variaciones entre perfiles de PFGE pueden deberse a mutaciones puntuales en el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, a inserciones o deleciones de grandes fagos o elementos móviles, a la ganancia o pérdida de plásmidos o a reordenamientos en el ADN (Barrett *et al.*, 2006). De hecho, se ha demostrado que los cambios en perfiles de PFGE entre aislados de ECVT O157:H7 relacionados se producen con mayor frecuencia como consecuencia de inserciones y deleciones que por mutaciones puntuales en los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción (Kudva *et al.*, 2002). Todas estas causas de variación de perfiles podrían explicar diferencias de entre uno y tres fragmentos de restricción entre aislados pertenecientes a una misma cepa responsable de un brote (Barrett *et al.*, 2006).

1.8.2. Análisis de secuencias repetitivas en tándem

La técnica del análisis de secuencias repetitivas en tándem (MLVA), del inglés *Multiple-Locus Variable-number tandem-repeats Analysis*, se fundamenta en la amplificación mediante PCR de determinadas regiones repetitivas dispersas en el genoma bacteriano y el análisis del número de repeticiones detectado en cada una de esas regiones. Dichas secuencias repetitivas de ADN, que varían en tamaño, localización y número de repeticiones, se denominan repeticiones variables en tándem o VNTR (del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*) (Nakamura *et al.*, 1987). Es justamente esta última característica, la variabilidad en el número de repeticiones que puede albergar la VNTR, lo que permite la discriminación bacteriana (Karama and Gyles, 2010). Una vez amplificadas las VNTR, se puede determinar el número de repeticiones que alberga cada una de ellas mediante tres vías: electroforesis en geles de agarosa/acrilamida (Kawamori *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2009a), electroforesis capilar (Lindstedt *et al.*, 2007) o secuenciación tipo Sanger (Noller *et al.*, 2003). Aunque es infrecuente, pueden darse situaciones como que dos productos de PCR con distinta longitud de fragmento de ADN presenten el mismo número de repeticiones de las VNTR (Bustamante *et al.*, 2009b), o que se observe un producto de PCR sin secuencia de repetición (Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Løbersli *et al.*, 2012) o con repeticiones incompletas (Holmes *et al.*, 2015). Es por ello que la secuenciación tipo Sanger es la más precisa a la hora de determinar el número de repeticiones que albergan las VNTR.

Las VNTR se consideran entre las regiones más variables del genoma en muchas especies bacterianas (van Belkum *et al.*, 1998), ya que pueden surgir como consecuencia de recombinaciones, defectos en el sistema de reparación o mutaciones o defectos durante la replicación del ADN. En este último caso puede deberse a errores de emparejamiento (*mispairing* en inglés), o al deslizamiento de las hebras (*slippage* en inglés), a causa de disociaciones de la ADN polimerasa (van Belkum *et al.*, 1998; Viguera *et al.*, 2001a, 2001b). El deslizamiento de las hebras puede llegar a causar errores de varias repeticiones. Si se produce hacia adelante da lugar a deleciones en la VNTR, mientras que si se produce hacia atrás da como resultado inserciones (Lovett and Feschenko, 1996). Otro proceso que puede originar una deleción es la formación de una estructura terciaria en la hebra de ADN molde durante la replicación, mientras que si la estructura terciaria se formara en la hebra de ADN nueva se produciría la inserción de una o varias repeticiones (Noller *et al.*, 2006). Existen múltiples factores que influyen en la frecuencia y el tipo de mutaciones que pueden aparecer en una VNTR, como el número de repeticiones que alberga, su composición en nucleótidos y el tamaño de la unidad de repetición. Cuanto mayor sea el número de repeticiones, mayor es la tasa de mutación por deslizamiento de la hebra de ADN debido a la inestabilidad

Introducción

estructural (Lai and Sun, 2003). Por otro lado, la existencia de múltiples repeticiones de G-T (guaninas y timinas) o de poli-pirimidinas, se ha asociado a una mayor tasa de mutación (Levinson and Gutman, 1987). En cuanto al tamaño de la unidad de repetición, aquéllas que tienen menos de seis pares de bases son más propensas a sufrir variaciones debido al deslizamiento de las hebras, mientras que las que poseen más de ocho pares de bases suelen presentar mayor frecuencia de mutación (van Belkum *et al.*, 1998). Por otra parte, en particular en ECVT O157:H7, se ha observado que la tasa de mutación en las VNTR está relacionada con el estrés causado por cambios en condiciones ambientales, como la temperatura o la disponibilidad de nutrientes, de manera que las altas temperaturas y la falta de nutrientes aumentan la tasa de mutación en las cepas de este serotipo (Cooley *et al.*, 2010).

Los primeros protocolos de MLVA adaptados para ECVT O157:H7 fueron publicados en 2003 (Lindstedt *et al.*, 2003; Noller *et al.*, 2003), a partir de la información obtenida a partir de la secuenciación del genoma completo de las cepas de ECVT O157:H7 EDL933 y Sakai (Lindstedt, 2005). Desde entonces, se han desarrollado distintos protocolos de MLVA para la subtipificación, tanto de *E. coli* en general (Lindstedt *et al.*, 2007; Løbersli *et al.*, 2012) como de ECVT O157 y no-O157 (Keys *et al.*, 2005; Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Cooley *et al.*, 2007; Kawamori *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2009a; Manges *et al.*, 2009; Izumiya *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2010a; Timmons *et al.*, 2016; Caméléna *et al.*, 2019). A partir de estos protocolos, se han subtipificado tanto aislados ECVT O157 y no-O157 de origen animal, ambiental y humano (Jay *et al.*, 2007; Cooley *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2008; Pei *et al.*, 2008; Urdahl *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2009b, 2009a, 2012; Jenke *et al.*, 2010, 2011; Miko *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2010a, 2010b; Döpfer *et al.*, 2010; Haugum *et al.*, 2011, 2014; Konno *et al.*, 2011; Prager *et al.*, 2011; Prendergast *et al.*, 2011; Sekse *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2011; Franci *et al.*, 2011; Amézquita-López *et al.*, 2012; Brandal *et al.*, 2012; Løbersli *et al.*, 2012; Mellor *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2013; González *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014c, 2014a; Söderlund *et al.*, 2014; Swirski *et al.*, 2014; Watahiki *et al.*, 2014; Byrne *et al.*, 2014; Krüger *et al.*, 2015; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2015; Widgren *et al.*, 2015; Sharapov *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2018; Sanso *et al.*, 2018), como aislados de *E. coli* pertenecientes a otros grupos patogénicos o aislados multirresistentes de *E. coli* (Börjesson *et al.*, 2016; Visvalingam *et al.*, 2016; Helldal *et al.*, 2017).

El protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller *et al.* (2003) incluye siete VNTR identificadas en el genoma de *E. coli* O157:H7. Por tanto, estas han sido seleccionadas específicamente para la subtipificación de aislados de este serotipo. Este protocolo y otros descritos que incluyen una o varias de las VNTR seleccionadas por Noller *et al.* (2003) han permitido

subtipificar con éxito aislados de brotes y casos esporádicos de infección (Noller *et al.*, 2003; Keys *et al.*, 2005; Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Pei *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2009a; Sakai *et al.*, 2010b; Izumiya *et al.*, 2010; Jenke *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2011; Dyet *et al.*, 2011; Konno *et al.*, 2011; Mellor *et al.*, 2013; Perry *et al.*, 2013; Söderlund *et al.*, 2014; Watahiki *et al.*, 2014; Byrne *et al.*, 2014; Berenger *et al.*, 2015; Dallman *et al.*, 2015; Rumore *et al.*, 2016). También han servido para establecer dinámicas y vías de diseminación de cepas de *E. coli* O157:H7 en estudios longitudinales realizados en explotaciones bovinas (Murphy *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2013; Widgren *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2017), así como para la subtipificación de colecciones con aislados de este serotipo obtenidos a partir de otras especies domésticas (oveja y cerdo) (Urdahl *et al.*, 2008; Prendergast *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2011) y salvajes (estorninos) (Williams *et al.*, 2011; Swirski *et al.*, 2014).

El protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* (2007) fue desarrollado para la subtipificación de aislados de *E. coli* en general independientemente de su serotipo. Ha servido para subtipificar tanto aislados ECVT O157:H7 como no-O157 procedentes de brotes y casos esporádicos de infección (Schimmer *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2009b; Miko *et al.*, 2010; Jenke *et al.*, 2011; Prager *et al.*, 2011; Brandal *et al.*, 2012; Staples *et al.*, 2012; Haugum *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014a, 2014c; Krüger *et al.*, 2015; Timmons *et al.*, 2016). También ha permitido subtipificar aislados ECVT procedentes de ganado bovino (Bustamante *et al.*, 2009b, 2012; Fernández *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014c; Krüger *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2018; Nakamura *et al.*, 2018; Sanso *et al.*, 2018) y ganado ovino (Sekse *et al.*, 2011; Brandal *et al.*, 2012). Además, fue empleado en un estudio longitudinal realizado en ovino para establecer la transferencia horizontal de genes de virulencia (Döpfer *et al.*, 2010), así como subtipificar aislados obtenidos a partir de alimentos (Manges *et al.*, 2009; Miko *et al.*, 2010; Franci *et al.*, 2011; González *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014c; Krüger *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2018; Sanso *et al.*, 2018) y de muestras ambientales (Cooley *et al.*, 2013; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2015). Estos trabajos se centraron principalmente en la subtipificación de colecciones con un importante número de aislados de serogrupos como O26, O111, O113, O145 y O157.

Al igual que la técnica de PFGE, la técnica de MLVA ha sido propuesta como herramienta de subtipificación para su uso en ECVT O157 por Pulsenet International, que dispone de protocolos estandarizados para distintas plataformas de electroforesis capilar (<http://www.pulsenetinternational.org/assets/Uploads/PNL19-MLVA-Beckman-Protocol.pdf>, <http://www.pulsenetinternational.org/assets/Uploads/PNL28-MLVA-ABI-3500-Protocol.pdf> y <http://www.pulsenetinternational.org/assets/Uploads/PNL23-MLVA-ABI-3130-Protocol.pdf>), con

Introducción

objeto de que los resultados puedan ser comparados entre laboratorios bajo unos estándares de calidad (Hyytiä-Trees *et al.*, 2010).

Aunque la técnica de MLVA se ha venido empleando en la subtipificación de *E. coli* desde el año 2003, hasta el momento no se han establecido unos criterios de interpretación comunes y consensados entre los distintos laboratorios, como ha sucedido, por ejemplo, para la técnica de PFGE. No obstante, a raíz de la experiencia adquirida mediante la subtipificación de aislados de ECVT O157:H7 obtenidos en situaciones de brote, Noller *et al.* (2003 y 2006) establecieron que aislados epidemiológicamente relacionados con perfiles de MLVA indistinguibles pertenecen a un mismo clon, y sugirieron que aislados con variaciones en una o dos repeticiones en una sola VNTR (SLV, del inglés *Single Locus Variant*) pueden tener un origen común y por tanto pertenecer a un mismo clon. Este criterio ha sido confirmado en distintos trabajos realizados con colecciones de aislados de ECVT O157:H7 pertenecientes a brotes, comparando los resultados con los obtenidos mediante otras técnicas como PFGE (Noller *et al.*, 2003; Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Dallman *et al.*, 2015). No obstante, estos mismos autores advirtieron de que si un aislado presuntamente relacionado con un brote presenta diferencias en dos VNTR (DLV, del inglés *Double Locus Variant*) con respecto a la cepa del brote, debería tenerse en cuenta tanto el número de repeticiones de variación en ambas VNTR como las características de los mismos en cuanto a su tasa de mutación para considerar que efectivamente comparten el mismo origen.

En este sentido, dos trabajos publicados en 2006 (Noller *et al.*, 2006; Vogler *et al.*, 2006) y otro publicado en 2013 (Bustamante *et al.*, 2013) estudiaron la presencia de mutaciones en las VNTR descritas en ECVT O157:H7. En todos ellos se concluyó que no se observan diferencias significativas en favor de las deleciones o inserciones de repeticiones en las VNTR. Además, se observó que alrededor de un 80% de las mutaciones observadas se debieron a variaciones de una repetición en una sola VNTR y que estas se explicaban por el deslizamiento de las hebras. El resto de mutaciones (20% aproximadamente) se debieron a deleción o inserción de múltiples repeticiones en una VNTR, que se explicaban por otros mecanismos de mutación como la recombinación. Por todo ello, la aparición de variaciones de una o varias repeticiones en una sola VNTR (SLV), o incluso en dos (DLV) sería asumible entre aislados con un origen común.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos perseguidos en la presente Tesis Doctoral fueron:

- Evaluar la aplicabilidad de la técnica de MLVA para subtipificar genotípicamente una colección de aislados de *E. coli* O157:H7 de origen animal y humano con y sin relación epidemiológica conocida y establecer las relaciones clonales existentes entre ellos, empleando la técnica de PFGE como referencia.

- Evaluar la aplicabilidad de la técnica de MLVA para subtipificar genotípicamente una colección de aislados de ECVT no-O157 de origen animal con y sin relación epidemiológica conocida pertenecientes a tres serogrupos distintos (O146, O91 y O5) y establecer las relaciones clonales existentes entre ellos, empleando la técnica de PFGE como referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislados objeto de estudio

Los aislados objeto de estudio pertenecen a la colección de aislados de *E. coli* O157:H7 y ECVT no-O157 de la Unidad de Patología Infecciosa del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura, integrada por 275 aislados de origen humano y animal, obtenidos estos últimos a partir de distintas especies de rumiantes tanto domésticos (ganado bovino, ovino y caprino) como salvajes (ciervo) y otras especies de interés cinegético (jabalí y conejo), en diversos estudios llevados a cabo en la Unidad entre los años 1997 y 2008. Los aislados de la colección se conservan a -80 °C en crioviales.

En total, este estudio se ha realizado con 181 aislados, distribuidos en dos grupos:

- 63 aislados de *E. coli* del serotipo O157:H7 bien caracterizados en estudios previos (Rey *et al.*, 2003, 2006; García-Sánchez *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2010, 2011; Sánchez *et al.*, 2010e, 2010d, 2010b), cuyas características genotípicas y fenotípicas e información epidemiológica disponible se presentan en la **Tabla 6**. Dentro de la selección se incluyen aislados con y sin relación epidemiológica conocida. Concretamente, entre los aislados con relación epidemiológica conocida, se estudiaron 36 aislados procedentes de tres explotaciones de ganado ovino, una ganadería bovina, dos fincas de caza de ciervo y jabalí, un brote de infección con tres personas afectadas de la misma Área de salud y un caso esporádico de infección. Por otra parte, entre los aislados sin relación epidemiológica conocida, se estudiaron 27 de origen humano y animal (ganado bovino, ovino y caprino, ciervo y jabalí) obtenidos en momentos y localizaciones geográficas distintas.

- 115 aislados de ECVT pertenecientes a los serogrupos O5 (24 aislados), O91 (52 aislados) y O146 (39 aislados), caracterizadas en estudios previos (Sánchez, 2008; Sánchez *et al.*, 2009b, 2010c), cuyas características genotípicas e información epidemiológica se presentan en las **Tablas 7, 8 y 9**. Se trata de aislados obtenidos durante un estudio longitudinal realizado en 12 explotaciones ovinas, en las cuales se monitorizó la presencia y persistencia de cepas ECVT durante un año completo en varios animales de cada una de las 12 explotaciones. De entre todos los aislados obtenidos en el estudio longitudinal, se seleccionaron para su inclusión en este estudio los aislados de los serogrupos O5, O91 y O146 obtenidos a partir de un mismo animal de manera secuencial que mostraron perfiles de la técnica de PFGE indistinguibles y/o altamente similares (con diferencias como máximo en tres fragmentos de restricción).

Tabla 6. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados.

Referencia	Fecha ^a	Localidad (Provincia)	Origen	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i> (tipo)	<i>ehxA</i>	Fermentación del sorbitol	Actividad β- Glucuronidasa	PFGE ^b	Epidemiología
FVCC1	--/97	Badajoz (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	13	Sin relación conocida
FVCC2	--/97	Badajoz (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	4	Sin relación conocida
FVCC3	--/97	Badajoz (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	29	Sin relación conocida
FVCC4	--/97	Badajoz (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	15	Sin relación conocida
FVCC5	--/97	Badajoz (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	16	Sin relación conocida
FVCC6	--/97	Badajoz (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	27	Sin relación conocida
FVCC7	--/97	Badajoz (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	29	Sin relación conocida
FVCC8	--/97	Badajoz (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	30	Sin relación conocida
FVCC9	--/97	Badajoz (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	-	-	-	28	Sin relación conocida
FVCC10	--/97	Cáceres (CC)	Humano	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	12	Sin relación conocida
FVCC11	--/97	Cáceres (CC)	Humano	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	10	Sin relación conocida
FVCC12	12/03	Badajoz (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	21	Sin relación conocida
FVCC13	01/04	Cáceres (CC)	Ciervo	-	+	+ (γ-1)	-	+	+	41	Sin relación conocida
FVCC14	03/04	Cáceres (CC)	Caprino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	14	Sin relación conocida
FVCC15	04/04	Badajoz (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	8	Sin relación conocida
FVCC16	12/04	Cáceres (CC)	Ciervo	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	40	Sin relación conocida
FVCC17	01/05	Cáceres (CC)	Ciervo	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	11	Sin relación conocida
FVCC18	04/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	19	Explotación 1
FVCC19	05/07	Badajoz (BA)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	36	Ganadería 1
FVCC20	05/07	Badajoz (BA)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	34	Ganadería 1
FVCC21	05/07	Badajoz (BA)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	34	Ganadería 1
FVCC22	05/07	Badajoz (BA)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	34	Ganadería 1
FVCC23	06/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	18	Explotación 1
FVCC24	06/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	17	Explotación 1
FVCC25	06/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	17	Explotación 1
FVCC26	06/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	20	Explotación 1
FVCC27	06/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	17	Explotación 1
FVCC28	06/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	17	Explotación 1
FVCC29	06/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	17	Explotación 1

Referencia	Fecha ^a	Localidad (Provincia)	Origen	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i> (tipo)	<i>ehxA</i>	Fermentación del sorbitol	Actividad β- Glucuronidasas	PFGE ^b	Epidemiología
FVCC30	06/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	17	Explotación 1
FVCC31	07/07	Valverde de Leganés (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	37	Explotación 2
FVCC32	07/07	Valverde de Leganés (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	37	Explotación 2
FVCC33	07/07	Valverde de Leganés (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	37	Explotación 2
FVCC34	07/07	Campanario (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	39	Sin relación conocida
FVCC35	07/07	Cáceres (CC)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	22	Sin relación conocida
FVCC36	07/07	Cáceres (CC)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	2	Sin relación conocida
FVCC37	07/07	Cáceres (CC)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	22	Sin relación conocida
FVCC38	07/07	Badajoz (BA)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	35	Ganadería 1
FVCC39	07/07	Badajoz (BA)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	34	Ganadería 1
FVCC40	07/07	Badajoz (BA)	Bovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	34	Ganadería 1
FVCC41	09/07	Valverde de Leganés (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	38	Explotación 2
FVCC42	10/07	Cáceres (CC)	Bovino	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	24	Sin relación conocida
FVCC43	10/07	Madrid (Madrid)	Jabalí	-	-	+ (γ-1)	+	-	-	1	Sin relación conocida
FVCC44	11/07	Cáceres (CC)	Humano	+	+	+ (γ-1)	+	-	-	3	Brote (Humano 1)
FVCC45	11/07	Cáceres (CC)	Humano	+	+	+ (γ-1)	+	-	-	3	Brote (Humano 2)
FVCC46	11/07	Cáceres (CC)	Humano	+	+	+ (γ-1)	+	-	-	3	Brote (Humano 3)
FVCC47	11/07	Cáceres (CC)	Humano	+	+	+ (γ-1)	+	-	-	3	Brote (Humano 1)
FVCC48	11/07	Cáceres (CC)	Humano	+	+	+ (γ-1)	+	-	-	3	Brote (Humano 1)
FVCC49	11/07	Membrío (CC)	Jabalí	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	31	Posible relación caso esporádico (Humano 4)
FVCC50	11/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	25	Explotación 3
FVCC51	11/07	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	26	Explotación 3
FVCC52	12/07	Cedillo (CC)	Jabalí	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	5	Finca 2
FVCC53	12/07	Cedillo (CC)	Jabalí	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	6	Finca 2
FVCC54	12/07	Cedillo (CC)	Jabalí	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	7	Finca 2
FVCC55	12/07	Membrío (CC)	Humano	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	31	Caso esporádico (Humano 4)
FVCC56	12/07	Membrío (CC)	Humano	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	31	Caso esporádico (Humano 4)

Materiales y métodos

Referencia	Fecha ^a	Localidad (Provincia)	Origen	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i> (tipo)	<i>ehxA</i>	Fermentación del sorbitol	Actividad β- Glucuronidasa	PFGE ^b	Epidemiología
FVCC57	12/07	Membrío (CC)	Humano	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	31	Caso esporádico (Humano 4)
FVCC58	02/08	Alía (CC)	Jabalí	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	5	Sin relación conocida
FVCC59	02/08	Puebla de Obando (BA)	Ciervo	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	32	Finca 1
FVCC60	02/08	Puebla de Obando (BA)	Ciervo	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	33	Finca 1
FVCC61	02/08	Membrío (CC)	Jabalí	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	23	Sin relación conocida
FVCC62	02/08	Castuera (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	9	Sin relación conocida
FVCC63	05/08	Villanueva de la Serena (BA)	Ovino	-	+	+ (γ-1)	+	-	-	5	Sin relación conocida

^a Fecha: mes/año. ^b Denominación de perfiles de la técnica de PFGE correspondiente a la asignación realizada en el presente estudio.

Tabla 7. Características genóticas de los aislados de ECVT del serogrupo O5 estudiados.

Referencia	Fecha ^a	Explotación	Animal	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	PFGE ^b
FCVTEC31	07/04	1	8	+	-	-	+	C7
FCVTEC33	09/04	1	8	+	-	-	+	C7
FCVTEC42	05/04	1	10	+	-	-	+	C9
FCVTEC44	06/04	1	10	+	-	-	+	C10
FCVTEC45	10/04	1	10	+	-	-	+	C9
FCVTEC58	05/04	2	2	+	-	-	+	C8
FCVTEC59	06/04	2	2	+	-	-	+	C7
FCVTEC64	11/03	2	5	+	-	-	+	C12
FCVTEC68	04/04	2	5	+	-	-	+	C7
FCVTEC89	11/03	2	12	+	-	-	+	C4
FCVTEC90	01/04	2	12	+	-	-	+	C5
FCVTEC92	03/04	2	12	+	-	-	+	C1
FCVTEC94	05/04	2	12	+	-	-	+	C2
FCVTEC95	06/04	2	12	+	-	-	+	C6
FCVTEC96	07/04	2	12	+	-	-	+	C1
FCVTEC97	09/04	2	12	+	-	-	+	C1
FCVTEC98	10/04	2	12	+	-	-	+	C2
FCVTEC99	02/04	2	12	+	-	-	+	C1
FCVTEC141	03/04	11	2	+	-	-	+	C1
FCVTEC142	04/04	11	2	+	-	-	+	C1
FCVTEC143	05/04	11	2	+	-	-	+	C3
FCVTEC144	07/04	11	2	+	-	-	+	C1
FCVTEC148	05/04	11	9	+	+	-	+	C13
FCVTEC149	07/04	11	9	+	+	-	+	C13

^a Fecha: mes/año. ^b Denominación de perfiles de PFGE correspondientes a la asignación realizada inicialmente en estudios previos.

Tabla 8. Características genotípicas de los aislados de ECVT del serogrupo O91 estudiados.

Referencia	Fecha ^a	Explotación	Animal	stx ₁	stx ₂	eae	ehxA	PFGE ^b
FCVTEC6	12/03	1	2	+	+	-	-	B5
FCVTEC7	03/04	1	2	+	+	-	-	B6
FCVTEC8	09/04	1	2	+	+	-	-	B5
FCVTEC11	10/03	1	4	+	+	-	-	B2
FCVTEC12	01/04	1	4	+	+	-	-	B1
FCVTEC13	04/04	1	4	+	+	-	-	B1
FCVTEC14	06/04	1	4	+	+	-	-	B1
FCVTEC15	07/04	1	4	+	+	-	-	B1
FCVTEC22	03/04	1	7	+	+	-	-	B1
FCVTEC23	05/04	1	7	+	+	-	-	B1
FCVTEC24	07/04	1	7	+	+	-	-	B1
FCVTEC36	01/04	1	9	+	+	-	-	B9
FCVTEC37	02/04	1	9	+	+	-	-	B8
FCVTEC38	03/04	1	9	+	+	-	-	B10
FCVTEC39	05/04	1	9	+	+	-	-	B8
FCVTEC49	01/04	1	12	+	+	-	-	B2
FCVTEC50	02/04	1	12	+	+	-	-	B1
FCVTEC62	01/04	2	3	+	+	-	-	B11
FCVTEC65	03/04	2	5	+	+	-	-	B20
FCVTEC66	11/03	2	5	+	+	-	-	B20
FCVTEC67	12/03	2	5	+	+	-	-	B20
FCVTEC69	04/04	2	5	+	+	-	-	B21
FCVTEC71	04/04	2	6	+	+	-	-	B7
FCVTEC73	12/03	2	8	+	+	-	+	B18
FCVTEC74	01/04	2	8	+	+	-	+	B17
FCVTEC75	04/04	2	8	+	+	-	+	B17
FCVTEC76	05/04	2	8	+	+	-	+	B17
FCVTEC77	07/04	2	8	+	+	-	+	B17
FCVTEC79	12/03	2	9	+	+	-	+	B13
FCVTEC80	01/04	2	9	+	+	-	+	B12
FCVTEC81	06/04	2	9	+	+	-	+	B12
FCVTEC82	01/04	2	10	+	+	-	-	B24
FCVTEC83	01/04	2	10	+	+	-	+	B25
FCVTEC84	12/03	2	11	+	+	-	-	B19
FCVTEC85	01/04	2	11	+	+	-	+	B19
FCVTEC86	03/04	2	11	+	+	-	+	B19
FCVTEC87	04/04	2	11	+	+	-	+	B19
FCVTEC91	01/04	2	12	+	+	-	-	B22
FCVTEC93	03/04	2	12	+	+	-	-	B23
FCVTEC100	01/04	7	1	+	+	-	+	B29
FCVTEC101	04/04	7	1	+	+	-	+	B28
FCVTEC102	05/04	7	1	+	+	-	+	B28
FCVTEC108	04/04	7	3	+	+	-	-	B14
FCVTEC109	09/04	7	3	+	+	-	-	B15
FCVTEC115	06/04	7	6	+	+	-	+	B28
FCVTEC116	10/04	7	6	+	+	-	+	B30
FCVTEC119	02/04	7	7	+	+	-	+	B30
FCVTEC120	05/04	7	7	+	+	-	+	B31

Referencia	Fecha ^a	Explotación	Animal	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	PFGE ^b
FCVTEC121	06/04	7	7	+	+	-	+	B32
FCVTEC130	11/03	7	10	+	+	-	+	B32
FCVTEC131	12/03	7	10	+	+	-	+	B32
FCVTEC135	10/04	7	10	+	+	-	+	B33

^a Fecha: mes/año. ^b Denominación de perfiles de PFGE correspondiente a la asignación realizada inicialmente en estudios previos.

Tabla 9. Características genóticas de los aislados de ECVT del serogrupo O146 estudiados.

Referencia	Fecha ^a	Explotación	Animal	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	PFGE ^b
FCVTEC1	11/03	1	1	+	+	-	+	A4
FCVTEC2	12/03	1	1	+	+	-	+	A4
FCVTEC3	01/04	1	1	+	+	-	+	A4
FCVTEC4	02/04	1	1	+	+	-	+	A4
FCVTEC5	03/04	1	1	+	+	-	+	A4
FCVTEC19	06/04	1	6	+	+	-	+	A17
FCVTEC20	07/04	1	6	+	+	-	+	A17
FCVTEC21	09/04	1	6	+	+	-	+	A17
FCVTEC26	01/04	1	8	+	+	-	+	A5
FCVTEC27	02/04	1	8	+	+	-	+	A5
FCVTEC28	03/04	1	8	+	+	-	+	A5
FCVTEC29	04/04	1	8	+	+	-	+	A5
FCVTEC30	05/04	1	8	+	+	-	+	A5
FCVTEC34	06/04	1	8	+	+	-	+	A7
FCVTEC32	07/04	1	8	+	+	-	+	A5
FCVTEC40	01/04	1	10	+	+	-	+	A5
FCVTEC41	02/04	1	10	+	+	-	+	A6
FCVTEC46	04/04	1	10	+	+	-	+	A5
FCVTEC51	05/04	1	12	+	+	-	+	A15
FCVTEC55	06/04	1	12	+	+	-	+	A15
FCVTEC52	07/04	1	12	+	+	-	+	A15
FCVTEC53	09/04	1	12	+	+	-	+	A15
FCVTEC54	10/04	1	12	+	+	-	+	A15
FCVTEC112	02/04	7	5	+	+	-	+	A1
FCVTEC113	04/04	7	5	+	+	-	+	A1
FCVTEC114	01/04	7	6	+	+	-	+	A16
FCVTEC117	02/04	7	6	+	+	-	+	A16
FCVTEC123	12/03	7	8	-	+	-	+	A18
FCVTEC124	01/04	7	8	-	+	-	+	A19
FCVTEC125	12/03	7	9	+	+	-	+	A2
FCVTEC126	01/04	7	9	+	+	-	+	A1
FCVTEC127	02/04	7	9	+	+	-	+	A1
FCVTEC128	07/04	7	9	+	+	-	+	A1
FCVTEC129	09/04	7	9	+	+	-	+	A1
FCVTEC132	01/04	7	10	+	+	-	+	A1
FCVTEC133	02/04	7	10	+	+	-	+	A3
FCVTEC136	04/04	7	10	+	+	-	+	A1
FCVTEC154	04/04	11	12	+	+	-	+	A10
FCVTEC155	09/04	11	12	+	+	-	+	A12

^a Fecha: mes/año. ^b Denominación de perfiles de PFGE correspondiente a la asignación realizada inicialmente en estudios previos.

3.2. Cepas control

En el ensayo de la técnica de MLVA con el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007) se empleó la cepa EDL933 (ECVT O157:H7) (W. L. Zhang *et al.*, 2002) como control positivo, y en el ensayo de PFGE se empleó la cepa H9812 (*Salmonella enterica* serovar Braenderup) (Hunter *et al.*, 2005) como referencia para la normalización de los distintos geles analizados.

3.3. Cultivo y extracción de ADN para el análisis de secuencias repetitivas en tándem

Los aislados se sembraron en agar Luria Bertani (LB) (Scharlab) e incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Para extraer el ADN de cada aislado se recogió el crecimiento aproximado de un cuadrado de 1 cm de lado con un asa y se suspendió en 250 µl de agua bidestilada estéril contenidos en un tubo eppendorf. Se calentó la suspensión a 100 °C (ebullición) durante 3-5 min para liberar el ADN y se centrifugó la suspensión tras el calentamiento (10.000 rpm/5 min) para extraer el sobrenadante, que se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

3.4. Análisis de secuencias repetitivas en tándem siguiendo el protocolo de Noller *et al.* (2003) para *E. coli* O157:H7

Este protocolo consiste en la amplificación mediante PCR de siete VNTR, cuyas secuencias se obtuvieron a partir de los genomas de las primeras cepas de *E. coli* O157:H7 secuenciadas al completo. Los cebadores empleados en la reacción de PCR se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Cebadores empleados en el protocolo de la técnica de MLVA descrita por Noller *et al.* (2003).

VNTR	Otros nombres*	Cebador 5' – 3'	Cebador 3' – 5'	Secuencia repetitiva 5' – 3'
TR1	Vhec4 / O157-9	ACTGCATGATAAGCCTCAGG	CACTGAAGCCTGTTCCGTTTC	AAATAG
TR2	Vhec1 / O157-10	CGCAGTTGATACCTACGG	GGAAGGAAGCTGATAGGT	TGGCTC
TR3	O157-17	TCTTGCAATATAGATTGG	TGATTAAGCGTGTACTGA	TATCTT
TR4	O157-25	GGTGATGGCTTGATATTGA	GCCCACTGCGAGTATAGAG	TGCAAA
TR5	Vhec3 / O157-3	GTTGATTATCATGGTATGTC	GGACAACCTTGTAGTACAAG	AAGGTG
TR6	Vhec2 / O157-34	GATGGTTCGACTAACCGTTAT	TAGCAGATGTTTCGTTCTT	TAAATAATCTACAGAAG
TR7	O157-19	CGCAGTGATCATTATTAGC	TGCTGAAACTGACGACCAGT	GACCAC

* Vhec y O157 son denominaciones de Lindstedt *et al.* (2003) y Keys *et al.* (2005) respectivamente

Materiales y métodos

Para llevar a cabo la PCR se empleó el kit Illustra PureTaq Ready-to-go PCR beads (GE Health-Care) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada reacción se añadieron 5 μl de ADN y 1 μl de cada cebador (0.33 μM) y agua bidestilada estéril hasta completar los 25 μl de volumen final. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad), donde las mezclas de reacción se sometieron a las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de desnaturalización (94 °C/4 min).
- 30 ciclos de desnaturalización – acoplamiento – polimerización (94 °C/45 s – 50 °C/45 s – 72 °C/1 min).
- 1 ciclo final de polimerización (72 °C/5 min).

Los productos amplificados en la reacción de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarosa MS-8, Pronadisa) al 1.8% en tampón TAE al 1% (Tris 40 mM, Acetato 20 mM y EDTA 1 mM). En cada pocillo del gel se añadieron 10 μl de muestra y 2 μl de tampón de carga y, como marcador de pesos moleculares se usaba el ADN del bacteriófago ΦX174 cortado con *HaeIII* (fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pb) (Promega). La electroforesis se realizó aplicando 95 V y 152 mA durante el tiempo necesario para que las muestras alcanzaran el extremo del gel. A continuación, los geles se teñían en un baño con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio (USB) y se observaron bajo la luz ultravioleta (transiluminador modelo MacroVue UV-20, Hoefer).

Una vez comprobada la obtención de un producto de PCR, se procedió a la purificación de los mismos mediante el kit de purificación Invisorb Fragment Clean Up (Invitek), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar la presencia de ADN purificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las mismas condiciones antes descritas, empleando 4 μl del producto de purificación.

Los productos fueron secuenciados con el kit de secuenciación Big Dye® Terminator Cycle v3.1 (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante usando un secuenciador 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems). Ambas secuencias (sentido y anti-sentido) del producto de PCR fueron obtenidas añadiendo 1 µl de cebador (sentido o anti-sentido), 5 µl de agua bidestilada estéril, 2 µl de la mezcla del tampón del kit y 2 µl de ADN purificado. Las mezclas de reacción se sometieron a las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de desnaturalización (94 °C/3 min).
- 25 ciclos de desnaturalización – acoplamiento – polimerización (96 °C/1 min – 58 °C/5 s – 60 °C/4 min).
- 1 ciclo final de polimerización (72 °C/1 min).

El análisis de las secuencias obtenidas para la determinación del número de repeticiones de cada VNTR y la asignación de perfiles alélicos se realizó con el *software* DNA Star (Lasergene). Las repeticiones parciales fueron redondeadas hasta la repetición más cercana tal y como se ha descrito previamente (Hyytiä-Trees *et al.*, 2006). Para un mejor seguimiento de los datos, el perfil de MLVA de cada aislado consistirá en el número de repeticiones identificado en cada VNTR del esquema, de acuerdo al siguiente orden: TR1, TR2, TR3, TR4, TR5, TR6, TR7.

3.5. Análisis de secuencias repetitivas en tándem siguiendo el protocolo modificado de Lindstedt *et al.* (2007) para *E. coli* O157:H7 y ECVT no-O157

Este protocolo consiste en la amplificación mediante PCR de siete VNTR mediante cebadores diseñados a partir de los genomas completos de cepas de *E. coli* disponibles en GenBank, seguida de la resolución de los productos obtenidos mediante electroforesis capilar. Los cebadores empleados para las reacciones de PCR en el presente estudio se basan en las secuencias de cebadores diseñadas por Lindstedt *et al.* (2007), con modificaciones en los fluoróforos empleados para adaptar el protocolo a las condiciones disponibles en nuestro laboratorio tal y como se muestran en la **Tabla 11**.

Materiales y métodos

Para llevar a cabo la PCR se empleó el kit de polimerasa BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante. El diseño de los cebadores permitió agrupar en 3 reacciones todas las PCRs, como a continuación se detalla:

- Reacción 1: 0.3 µl (10 pmol) de cada cebador de las VNTR CVN003 y CVN014.
- Reacción 2: 0.3 µl (10 pmol) de cada cebador de las VNTR CVN001, CVN004, CVN007 y CVN015.
- Reacción 3: 0.3 µl (10 pmol) de cada cebador de la VNTR CVN002.

A cada mezcla de reacción se le añadieron 5 µl de ADN (de la extracción obtenida el **apartado 3.3**) y fueron sometidas a las siguientes condiciones:

- **Mezclas de reacción 1 y 2:**
 - Un ciclo de desnaturalización (94 °C/2 min).
 - 35 ciclos de desnaturalización – acoplamiento – polimerización (94 °C/1 min – 56 °C/1 min – 72 °C/1 min).
 - Un ciclo final de polimerización (72 °C/7 min).
- **Mezcla de reacción 3:**
 - Un ciclo de desnaturalización (94 °C/2 min).
 - 25 ciclos de desnaturalización – acoplamiento – polimerización (94 °C/30 s – 50 °C/30 s – 72 °C/1 min).
 - Un ciclo final de polimerización (72 °C/7 min).

Los productos amplificados en la reacción de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarosa MS-8, Pronadisa) al 2.5% en tampón TAE al 1% (Tris 40 mM, Acetato 20 mM y EDTA 1 mM). En cada pocillo del gel se añadieron 10 µl de muestra y 2 µl de tampón de carga y, como marcador de pesos moleculares se usaba el ADN del bacteriófago ΦX174 cortado con *HaeIII* (fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pb) (Promega). La electroforesis se realizó aplicando 95 V y 152 mA durante el tiempo necesario para que las muestras alcanzaran el extremo del gel. A continuación, los geles se teñían en un baño con 1 µg/ml de

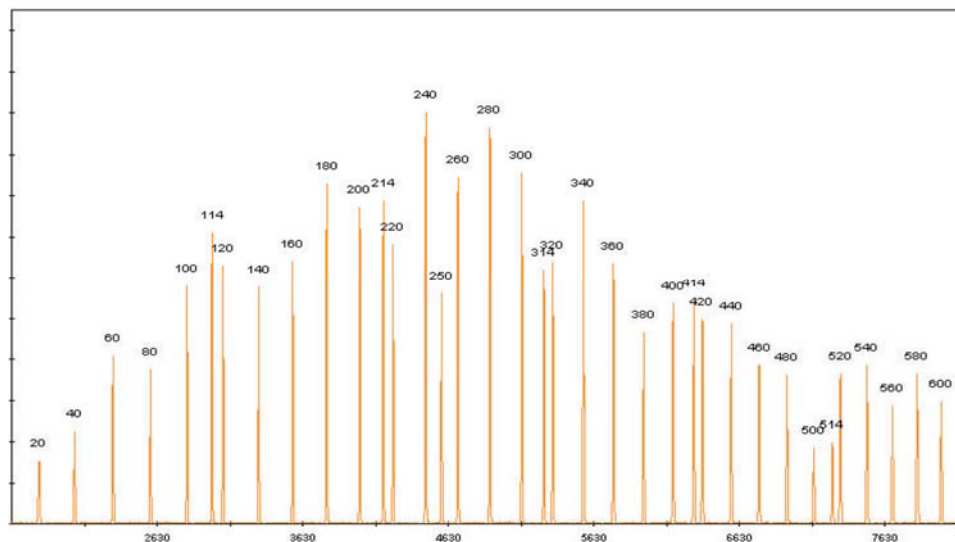
bromuro de etidio (USB) y se observaron bajo la luz ultravioleta (transiluminador modelo MacroVue UV-20, Hoefer).

Una vez comprobada la obtención de un producto de PCR, se preparó una placa de 96 pocillos con 1 µl de cada producto de PCR en dos mezclas:

- **Mezcla de reacción A:** con los componentes de la mezcla de reacción 2.
- **Mezcla de reacción B:** con los componentes de las mezclas de reacción 1 y 3.

Además, se incorporó en cada pocillo 1 µl del marcador de peso molecular GeneScant^m 600 LIZ[®] (Life Technologies) (**Ilustración 7**) y 12 µl de formamida. La mezcla fue centrifugada y se le aplicó un protocolo térmico de desnaturalización durante 2 min a 94 °C para posteriormente, enfriarla hasta -20 °C durante 3 min, antes de realizar la electroforesis capilar en un equipo ABI-3130 Genetic Analyzer (Applied-Biosystems). La electroforesis se llevó a cabo a 60 °C durante 35 min empleando el polímero POP7 (Applied-Biosystems) con un voltaje de inyección de 15 kV durante 5 s, manteniendo un voltaje de 15 Kv hasta el final. Cada pico fue identificado con respecto al color del fluoróforo y el tamaño. En cada placa de reacción se empleó la cepa EDL933 como control.

Ilustración 7. Electroferograma del marcador de peso molecular GeneScant^m 600 LIZ[®] (Life Technologiestm).



En los casos en los que no se obtuvo producto de PCR se repitieron las reacciones de forma individual aumentando el tiempo de extensión, con objeto de amplificar posibles productos de

Materiales y métodos

mayor tamaño debido a la presencia de posibles elementos de inserción u otros eventos genéticos. Sin embargo, en ninguno de los casos se consiguió la amplificación.

Los productos de electroforesis capilar de la cepa control EDL933 fueron secuenciados, y la asignación de alelos en cada uno de los aislados se realizó con respecto al número de repeticiones obtenidas en la cepa control. Por tanto, se asumió como limitación del presente trabajo que, en algún caso puntual, las repeticiones estimadas pudieran no reflejar el número real de repeticiones presentes en la VNTR estudiada.

Para un mejor seguimiento de los datos, el perfil de MLVA de cada aislado consistirá en el número de repeticiones identificado en cada VNTR del esquema, de acuerdo con el siguiente orden: CVN001, CVN002, CVN003, CVN004, CVN007, CVN014, CVN015.

Tabla 11. Cebadores empleados para amplificar las VNTR basados en el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* (2007).

VNTR	Cebador 5' – 3' * †	Cebador 3' – 5'	Secuencia repetitiva 5' – 3'
CVN001	PET -AACCGGCTGGGGCGAATCC	GGCGGCGGTGTCAGCAAATC	CAGCAGCCGCAACAACCGGTTGCGCCGCAGCAGCAATAT
CVN002	NED -AACCGTTATGAARGRAAGTCCT	TCGCCCAGTAAGTATGAAATC	TTAATAATCCACAGGAG
CVN003	6FAM -AAAAATCCGGATGAG WT GGTC	TTGCGTTGTCAGTAATTTGTTTCAG	TGCTACCCCGGACGG
CVN004	VIC - <i>MG</i> CTGCGG CR CTGAAGAAGA	CCCGGCAGGCGAAGCATTGT	AGCAGCAAAAGCGGC
CVN007	6FAM -ACCGTGGCTCCAG Y TGATTC	ACCAGTGTTGCGCCAGTGTC	ACCACG
CVN014	6FAM - TCCCCGCAATCAGCA M ACAAAGA	GCAG CR GGGACAACGGAAGC	TGCAGG
CVN015	NED - TAGGCATAGCGCACAGACAGATAA	GTACCGCCGA ACTT CAACTC	CATCAC

* Las letras en negrita representan el fluoróforo empleado para marcar el cebador.

† Las letras en cursiva y negrita representan las distintas bases degeneradas, según el código de la IUPAC: M=A ó C; R=A ó G; W=A ó T; Y=C ó T.

3.6. Análisis de los datos de secuencias repetitivas en tándem obtenidos con ambos protocolos

El número de repeticiones en cada VNTR y alelos asignados fueron incorporados al *software* InfoQuest™ FP (Bio-Rad). Cuando no se obtuvo producto de PCR o bien cuando, a pesar de haberlo obtenido, no se encontraron las secuencias repetitivas esperadas, se asignó un alelo nulo, que fue designado como "0". Dichos alelos se han tenido en cuenta a la hora de contabilizar el número de alelos identificados para cada VNTR. El perfil de MLVA de cada aislado obtenido con el protocolo de la técnica de Noller *et al.* consistirá en el número de repeticiones identificado en cada VNTR del esquema, de acuerdo con el siguiente orden: TR1, TR2, TR3, TR4, TR5, TR6, TR7. Por su parte, el perfil de MLVA de cada aislado obtenido con el protocolo de la técnica de Lindstedt *et al.* consistirá en el número de repeticiones identificado en cada VNTR del esquema, de acuerdo con el siguiente orden: CVN001, CVN002, CVN003, CVN004, CVN007, CVN014, CVN015. Se consideró como criterio de discriminación entre perfiles cualquier diferencia apreciable, es decir una diferencia de una sola repetición en una VNTR.

Con los datos obtenidos, se generaron tanto dendrogramas como árboles de mínima expansión (MST) empleando el *software* InfoQuest™ FP (Bio-Rad) y se realizó el cálculo del índice de diversidad (ID) (Noller *et al.*, 2003) y el poder de discriminación de las técnicas (Hunter and Gaston, 1988; Hunter, 1990) sin considerar los alelos nulos empleando el *software* "V-Dice" (<http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>). Los dendrogramas se generaron tratando los valores como categóricos y usando el método de UPGMA. Los MST se generaron tratando los valores como categóricos y considerando como prioritarios los perfiles de MLVA con el mayor número de SLV, los perfiles con mayor número de DLV y empleando el mayor número de perfiles posible. En el MST, los perfiles se agruparon siguiendo el criterio de que los componentes del mismo grupo presentaran como máximo una SLV y que tuvieran como mínimo un perfil de MLVA.

3.7. Técnica de Electroforesis en campo pulsante

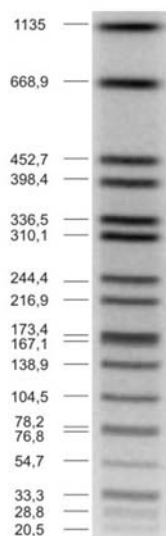
Los perfiles de PFGE de los aislados objeto de estudio fueron obtenidos aplicando el protocolo estandarizado descrito por PulseNet International (www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf), que se compone de los siguientes pasos:

- Siembra de las cepas en TSA e incubación a 37 °C durante 18-24 h.
- Preparación de suspensiones bacterianas en tampón CSB (Tris 100 mM, EDTA 100 mM) a pH 8, a razón de 2 ml por cepa, con proteinasa K (Roche), a razón de 0.5 mg/ml.
- Ajuste de la densidad celular, haciendo una lectura de la absorbancia de las suspensiones a 420 nm en el espectrofotómetro y ajustando a una absorbancia final de 0.8. Para diluir se usaba la solución de CSB a pH 8 con proteinasa K.
- Preparación de los bloques de agarosa, empleando una agarosa para PFGE (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad) al 1% en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) a pH 8. Se atemperaba en un baño térmico a 54 °C y se mezclaba en proporción 1:1 con la suspensión bacteriana (tomando 500 µl de cada), se homogenizaba y se repartía en los moldes, dejando solidificar en nevera a 4 °C o en bandeja sobre hielo.
- Lisis bacteriana en los bloques de agarosa, colocando los bloques ya solidificados en 2 ml de tampón de lisis (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, sarkosyl 1%) a pH 8, a razón de 2 ml por cepa, con proteinasa K (añadida justo antes de su uso), a razón de 0.1 mg/ml. Se incubaba durante un mínimo de 2 h en un baño térmico en agitación a 54 °C.
- Lavado de los bloques de agarosa, mediante 2 lavados en 5 ml de agua miliQ estéril y 5 lavados en 5 ml de tampón TE a pH 8 (7 lavados en total), todos ellos con el baño a 50 °C y en agitación. Una vez finalizado el último lavado los bloques de agarosa se guardaban en tampón TE fresco a 4 °C.
- Digestión del ADN genómico, para lo cual se cortaba un tercio (inserto) del bloque de agarosa (los dos tercios restantes se guardaban en TE fresco a 4 °C por si era necesario repetir la digestión), en dos fases:

- Pre-incubación: por cada muestra se mezclaban 90 µl de agua miliQ estéril comercial (Sigma) con 10 µl de tampón H (Roche) y se incubaba a 37 °C durante 30 min.
- Digestión: por cada muestra se mezclaban 90 µl de agua miliQ estéril comercial con 10 µl de tampón H y 5 µl de enzima *Xba*I (Roche) (50 U por bloque) y se incubaba a 37 °C durante un mínimo de 4 h.
- Preparación del gel de agarosa, empleando la misma agarosa que para los bloques, pero al 1.2% en tampón TBE 0.5x (Tris 44 mM, ácido bórico 44 mM, EDTA 1 mM). Una vez solidificado se colocaban los insertos de agarosa en sus correspondientes pocillos del gel y se sellaban los pocillos con agarosa al 1% en tampón TBE 0.5x. En las posiciones 1, 8 y 15 se colocaba un inserto de la cepa H9812 como referencia para la normalización del gel durante su análisis (**Ilustración 8**).
- Electroforesis, que se llevaba a cabo en un equipo CHEF Mapper® (Bio-Rad), llenando la cubeta con 2.5 l de tampón TBE 0.5x y ajustando su temperatura a 14 °C, durante un total de 22 h con pulsos de 2.2 a 54.2 s en progresión lineal. Condiciones de la electroforesis:
 - Pulso inicial: **2.2 s**.
 - Pulso final: **54.2 s**.
 - Rampa: **lineal**.
 - Temperatura del tampón: **14 °C**.
 - Tiempo: **22 h**.
 - Voltaje: **6 V/cm**.
 - Ángulo: 120° (60°/-60°).
- Tinción del gel en un baño con 1 µg/ml de bromuro de etidio (USB), añadiendo 50 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml (USB) a 500 ml de tampón TBE extraído de la cubeta, durante aproximadamente 45-60 min en agitación suave. Transcurrido ese tiempo se procedía a lavar el gel en 500 ml de agua destilada durante otros 15-30 min en agitación suave.
- Adquisición de imágenes en formato TIFF empleando un equipo de fotocaptura Gel Doc XR (Bio-Rad).

- Análisis de los archivos TIFF obtenidos se realizó mediante el *software* InfoQuestTMFP (Bio-Rad), usando el coeficiente de similaridad de Dice y el método UPGMA para generar dendrogramas. El valor de tolerancia fue calculado comparando los perfiles obtenidos en cada gel para la cepa H9812. En la asignación de bandas para la constitución de los distintos perfiles de PFGE, los fragmentos con un peso molecular inferior a 33.3 kb (situados por debajo del decimosexto fragmento en el patrón de la cepa H9812) fueron ignorados en el análisis. Siguiendo las indicaciones del sistema PulseNet, se consideró como criterio de discriminación entre perfiles cualquier diferencia apreciable, es decir, una diferencia de un solo fragmento de restricción (Barrett *et al.*, 2006). Las denominaciones de los perfiles de PFGE en aislados de *E. coli* O157:H7 mostradas en la tabla del **apartado 3.1** son las asignadas en este estudio. Sin embargo, las denominaciones de los perfiles de PFGE en aislados no-O157 de los serogrupos O5, O91 y O146 mostradas en las tablas del **apartado 3.1** son las asignadas inicialmente en estudios previos. Además, se realizó el cálculo del ID tal y como se menciona en el **apartado 3.6**.

Ilustración 8. Tamaño aproximado (en kb) de las bandas correspondientes al perfil de la cepa H9812 sometida a restricción con *Xba*I y electroforesis en las condiciones estándar de PFGE de PulseNet específicas para *E. coli* O157:H7.



Fuente: (Hunter *et al.*, 2005)

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7 mediante la técnica de MLVA con el protocolo de Noller *et al.* (2003)

Se identificó un total de 35 perfiles entre los 63 aislados analizados con este protocolo (**Tabla 12**). Algunos de estos perfiles aglutinaron un gran número de aislados, como por ejemplo el perfil 10 con 9 aislados, mientras que otros perfiles únicamente incluyeron un aislado (**Ilustración 10**). En todos los casos se consiguió la amplificación mediante PCR, si bien en el caso de TR1 en el aislado FVCC13 no se observaron repeticiones de la secuencia esperada al secuenciar el producto.

Tabla 12. Perfiles de MLVA asignados a los aislados de *E. coli* O157:H7 aplicando el protocolo de MLVA de Noller *et al.* (2003).

Referencia	Nº de repeticiones							Perfil de MLVA
	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7	
FVCC1	9	25	6	4	5	2	7	5
FVCC2	6	34	3	2	12	1	5	35
FVCC3	8	18	4	2	5	2	8	4
FVCC4	8	17	4	2	5	2	7	1
FVCC5	8	17	4	2	5	2	7	1
FVCC6	6	33	4	3	12	2	6	14
FVCC7	8	17	4	2	5	2	7	1
FVCC8	8	17	4	2	5	2	7	1
FVCC9	6	32	4	3	12	2	6	15
FVCC10	9	30	5	4	20	2	6	32
FVCC11	9	27	5	4	20	2	6	33
FVCC12	7	37	4	3	15	2	6	11
FVCC13	0	18	4	1	4	2	4	6
FVCC14	5	24	7	3	5	1	6	26
FVCC15	9	30	5	5	20	2	4	34
FVCC16	10	27	5	3	13	2	7	23
FVCC17	11	26	5	3	13	2	7	24
FVCC18	7	11	4	3	13	2	6	10
FVCC19	13	14	6	4	8	2	8	27
FVCC20	13	14	6	4	8	2	8	27
FVCC21	13	14	6	4	8	2	8	27
FVCC22	13	14	6	4	8	2	8	27
FVCC23	7	11	4	3	13	2	6	10
FVCC24	7	11	4	3	13	2	6	10
FVCC25	7	11	4	3	13	2	6	10

Resultados

Referencia	Nº de repeticiones							Perfil de MLVA
	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7	
FVCC26	7	11	4	3	13	2	6	10
FVCC27	7	11	4	3	13	2	6	10
FVCC28	7	11	4	3	13	2	6	10
FVCC29	7	11	4	3	13	2	6	10
FVCC30	7	11	4	3	13	2	6	10
FVCC31	7	28	6	3	5	2	6	19
FVCC32	7	29	6	3	5	2	6	18
FVCC33	7	28	6	3	5	2	6	19
FVCC34	11	34	6	3	5	2	6	20
FVCC35	6	27	3	3	17	2	7	25
FVCC36	12	48	4	5	3	2	8	9
FVCC37	8	58	3	3	9	2	6	22
FVCC38	13	14	6	4	8	2	8	27
FVCC39	13	14	6	4	8	2	8	27
FVCC40	13	14	6	4	8	2	8	27
FVCC41	7	29	6	3	5	2	6	18
FVCC42	10	24	4	3	8	2	6	17
FVCC43	13	17	5	3	9	2	6	21
FVCC44	5	12	6	3	19	2	8	28
FVCC45	5	12	6	3	19	2	8	28
FVCC46	5	12	6	3	19	2	8	28
FVCC47	5	12	6	3	19	2	8	28
FVCC48	5	12	6	3	19	2	8	28
FVCC49	8	20	4	2	5	2	7	3
FVCC50	11	17	4	3	8	2	6	16
FVCC51	11	17	4	3	8	2	6	16
FVCC52	13	35	3	5	8	2	7	7
FVCC53	13	35	3	5	8	2	7	7
FVCC54	8	35	3	5	8	2	7	8
FVCC55	8	18	4	2	5	2	7	2
FVCC56	8	18	4	2	5	2	7	2
FVCC57	8	18	4	2	5	2	7	2
FVCC58	15	29	5	5	7	2	4	31
FVCC59	8	34	5	6	18	2	4	29
FVCC60	8	34	5	6	18	2	4	29
FVCC61	6	22	4	3	16	2	6	12
FVCC62	7	22	4	3	16	2	6	13
FVCC63	11	24	4	5	18	2	4	30

Los IDs observados en cada una de las VNTR incluidas en este protocolo variaron entre 0.062 y 0.939 (TR6 y TR2 respectivamente) (**Tabla 13**). TR2 presentó un total de 21 alelos distintos, aportando junto con TR5 y TR1 la mayor diversidad. El poder de discriminación de la técnica de MLVA con el protocolo de Noller *et al.* (2003) fue de 0.959, con 35 perfiles distintos entre los 63 aislados estudiados (**Tabla 6 e Ilustración 9 y 10**), mientras que para la técnica de PFGE fue de 0.975 con 41 perfiles distintos (**Tabla 6 e Ilustración 11**).

Tabla 13. Características de las VNTR y resultados obtenidos en los aislados de *E. coli* O157:H7 aplicando el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller *et al.* (2003).

VNTR	Tamaño (pb)	Secuencia repetitiva 5' – 3'	Nº de repeticiones		Nº alelos*	Alelos nulos	ID**
			Mínimo	Máximo			
TR1	6	AAATAG	5	15	11	+	0.862
TR2	6	TGGCTC	11	58	21	-	0.939
TR3	6	TATCTT	3	7	5	-	0.688
TR4	6	TGCAA	1	6	6	-	0.672
TR5	6	AAGGTG	3	20	14	-	0.860
TR6	18	TTAAATAATCTACAGAAG	1	2	2	-	0.062
TR7	6	GACCAC	4	8	5	-	0.712

* Número de alelos contando la presencia de alelos nulos.

** ID: índice de diversidad sin considerar la presencia de alelos nulos.

De acuerdo con la bibliografía consultada, tal y como se ha expuesto anteriormente, el criterio que se aplicó para el análisis de los resultados de la técnica de MLVA fue considerar como aislados con un origen común, o pertenecientes a un mismo clon, aquéllos cuyos perfiles presentaban variaciones de una o varias repeticiones en una sola VNTR (SLV) o incluso en dos (DLV), además de información epidemiológica que lo apoyara. En el caso de la técnica de PFGE, empleada como referencia en el análisis, de acuerdo con los criterios de Tenover *et al.* (1995) y Barrett *et al.* (2006), se consideraron como aislados con un origen común o pertenecientes a un mismo clon, aquéllos cuyos perfiles presentaban diferencias de hasta tres fragmentos de restricción, además de información epidemiológica que lo apoyara.

El análisis de los resultados se llevó a cabo considerando globalmente los 63 aislados objeto de estudio (**Ilustración 9-11**) y considerando de forma separada los 36 aislados con información epidemiológica disponible (**Tabla 6, Ilustración 12-19**) por un lado y los 27 aislados sin información epidemiológica disponible (**Tabla 6, Ilustración 20-23**) por otro.

Resultados

De una parte, al considerar los aislados con información epidemiológica disponible se observó que los aislados pertenecientes a las explotaciones 1 (**Ilustración 12**) y 3 (**Ilustración 13**), la ganadería 1 (**Ilustración 14**) y la finca 1 (**Ilustración 15**), presentaron perfiles de MLVA indistinguibles entre ellos. Al comparar los resultados con los obtenidos mediante PFGE (**Ilustración 11 a 15**), aunque con esta técnica se obtuvo un mayor número de perfiles en todos los casos, éstos mostraron siempre diferencias de entre 1 y 3 fragmentos de restricción (similaridad > 91%). Éste es el caso, por ejemplo, de la explotación 1 (**Ilustración 12**), donde aislados con un solo perfil de MLVA (perfil 0010) presentaron hasta cuatro perfiles distintos de PFGE (0017, 0018, 0019 y 0020) aunque con una alta similaridad entre todos ellos (96.6%).

De igual forma, entre los cinco aislados obtenidos a partir de tres pacientes implicados en un brote de infección ocurrido en un intervalo de aproximadamente 15 días (**Ilustración 16**) se observó un solo perfil de MLVA (perfil 0028). Tres de los aislados (FVCC44, FVCC47 y FVCC48) procedían del mismo paciente y fueron obtenidos a partir de muestras tomadas secuencialmente con varios días de diferencia. Este mismo hecho se apreció entre los aislados FVCC55, FVCC56 y FVCC57 (perfil 0002), procedentes de un caso esporádico de infección, obtenidos a partir de muestras del paciente tomadas también de manera secuencial (**Ilustración 17**). Además, al comparar este perfil (8-18-4-2-5-2-7) con los del resto de la colección, se identificó un perfil (perfil 0003) con una SLV de diferencia (8-20-4-2-5-2-7) correspondiente a un aislado (FVCC49) obtenido a partir de las heces de un jabalí abatido un mes antes en la misma área de salud (**Tabla 6**). En ambas situaciones (brote y caso esporádico de infección), los aislados anteriormente mencionados mostraron perfiles de PFGE indistinguibles, incluso entre los aislados del caso esporádico y el aislado de jabalí (**Ilustración 16 y 17**).

Finalmente, entre los aislados pertenecientes a la explotación 2 (**Ilustración 18**) se obtuvieron dos perfiles de MLVA [perfil 0018: (7-29-6-3-5-2-6) y perfil 0019 (7-28-6-3-5-2-6)] con una SLV de diferencia y dos perfiles de PFGE (0037 y 0038) con dos fragmentos de restricción de diferencia entre ellos (93,7% de similaridad). De igual forma, los aislados obtenidos en la finca 2 (**Ilustración 19**) presentaron dos perfiles distintos de MLVA [perfil 0007 (13-35-3-5-8-2-7) y perfil 0008 (8-35-3-5-8-2-7)] con una SLV de diferencia y tres perfiles distintos de PFGE (0005, 0006 y 0007) con diferencias de entre uno y dos fragmentos de restricción entre ellos (>95% de similaridad).

De otra parte, al considerar los aislados sin información epidemiológica disponible, aunque con ambas técnicas se obtuvo el mismo número de perfiles (24 en total) (**Ilustración 20 y 21**), se observaron discrepancias entre las técnicas en dos sentidos. Por un lado, se observaron casos de SLV o DLV entre perfiles de MLVA en aislados con perfiles de PFGE con más de 3 fragmentos de restricción de diferencia. Éste es el caso, por ejemplo, de los perfiles de MLVA obtenidos en los aislados FVCC3 [perfil 0004 (8-18-4-2-5-2-8)], FVCC4, FVCC5, FVCC7 y FVCC8 [perfil 0001 (8-17-4-2-5-2-7)], que presentaron una DLV de diferencia, aunque se correspondieron con cuatro perfiles distintos de PFGE (0015, 0016, 0029 y 0030) con hasta seis fragmentos de restricción de diferencia entre ellos (85,7% de similaridad) (**Ilustración 21**). Este grupo de perfiles de MLVA mostraba a su vez una SLV de diferencia con los aislados del caso esporádico de infección (FVCC55 – FVCC57, perfil 0002) y el aislado de jabalí posiblemente relacionado con él (FVCC49, perfil 0003), y en algunos casos (perfiles 0029, 0030 y 0031) se correspondían con perfiles de PFGE con menos de tres fragmentos de restricción de diferencia entre ellos (>92% de similaridad) (**Ilustración 22**). No obstante, la distancia temporal de los aislados y la falta de información epidemiológica impidieron establecer conclusiones acerca de sus relaciones clonales (**Tabla 6**).

Por otro lado, se observaron perfiles de MLVA claramente diferentes en aislados con perfiles de PFGE indistinguibles. Éste es el caso, por ejemplo, de los perfiles de MLVA obtenidos en los aislados FVCC52 [perfil 0007 (13-35-3-5-8-2-7)], FVCC63 [perfil 0030 (11-24-4-5-18-2-4)] y FVCC58 [perfil 0031 (15-29-5-5-7-2-4)], que se diferenciaron en cuatro o cinco VNTR, aunque se correspondieron con un mismo perfil de PFGE (0005) (**Ilustración 23**). Es también el caso de los perfiles de MLVA obtenidos en los aislados FVCC35 [perfil 0025 (6-27-3-3-17-2-7)] y FVCC37 [perfil 0022 (8-58-3-3-9-2-6)], que se diferenciaron en cuatro VNTR, aunque se correspondieron con un mismo perfil de PFGE (0022) (**Ilustración 23**). No obstante, la distancia temporal de los aislados y la falta de información epidemiológica de nuevo impidieron establecer conclusiones acerca de sus relaciones clonales (**Tabla 6**).

Resultados

Ilustración 9. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 63 aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003).

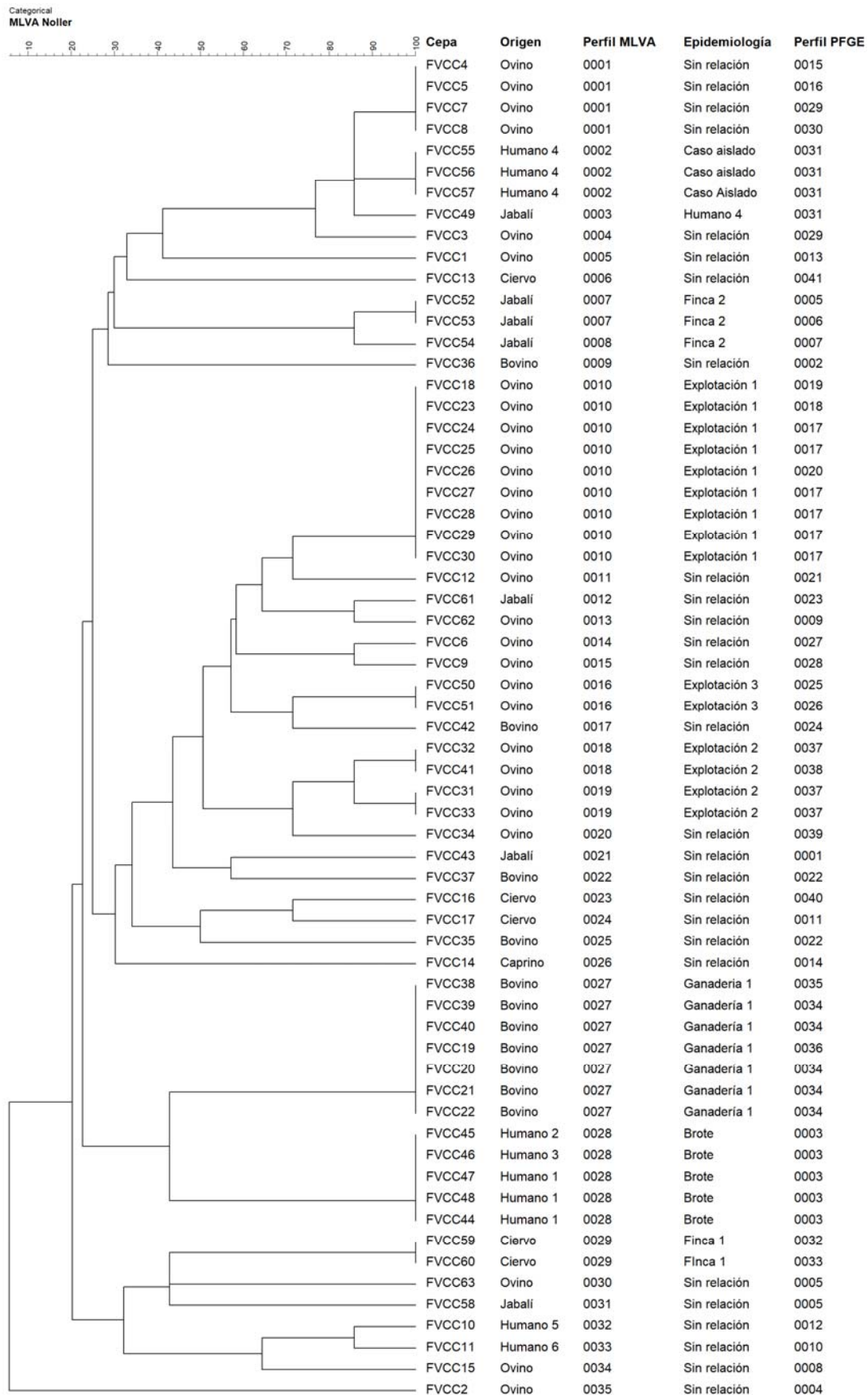
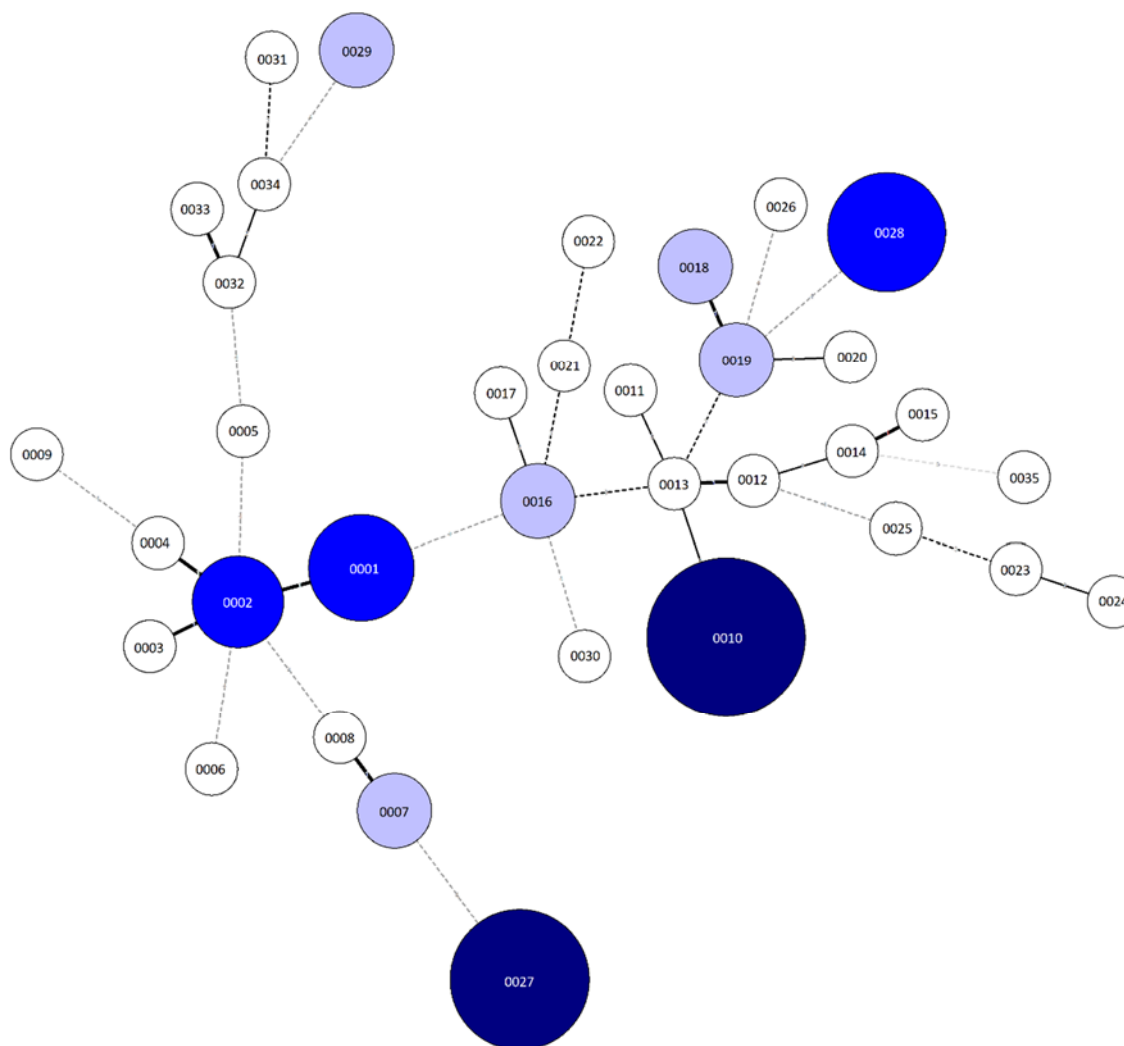


Ilustración 10. Árbol de mínima expansión correspondiente a los 63 aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados mediante el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003).



Círculo blanco: perfil representado por un solo aislado. **Círculo morado:** perfil representado por dos aislados. **Círculo azul claro:** perfil representado por 3, 4 o 5 aislados. **Círculo azul oscuro:** perfil representado por hasta 10 aislados.

Resultados

Ilustración 11. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice correspondiente a los 63 aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados mediante PFGE.

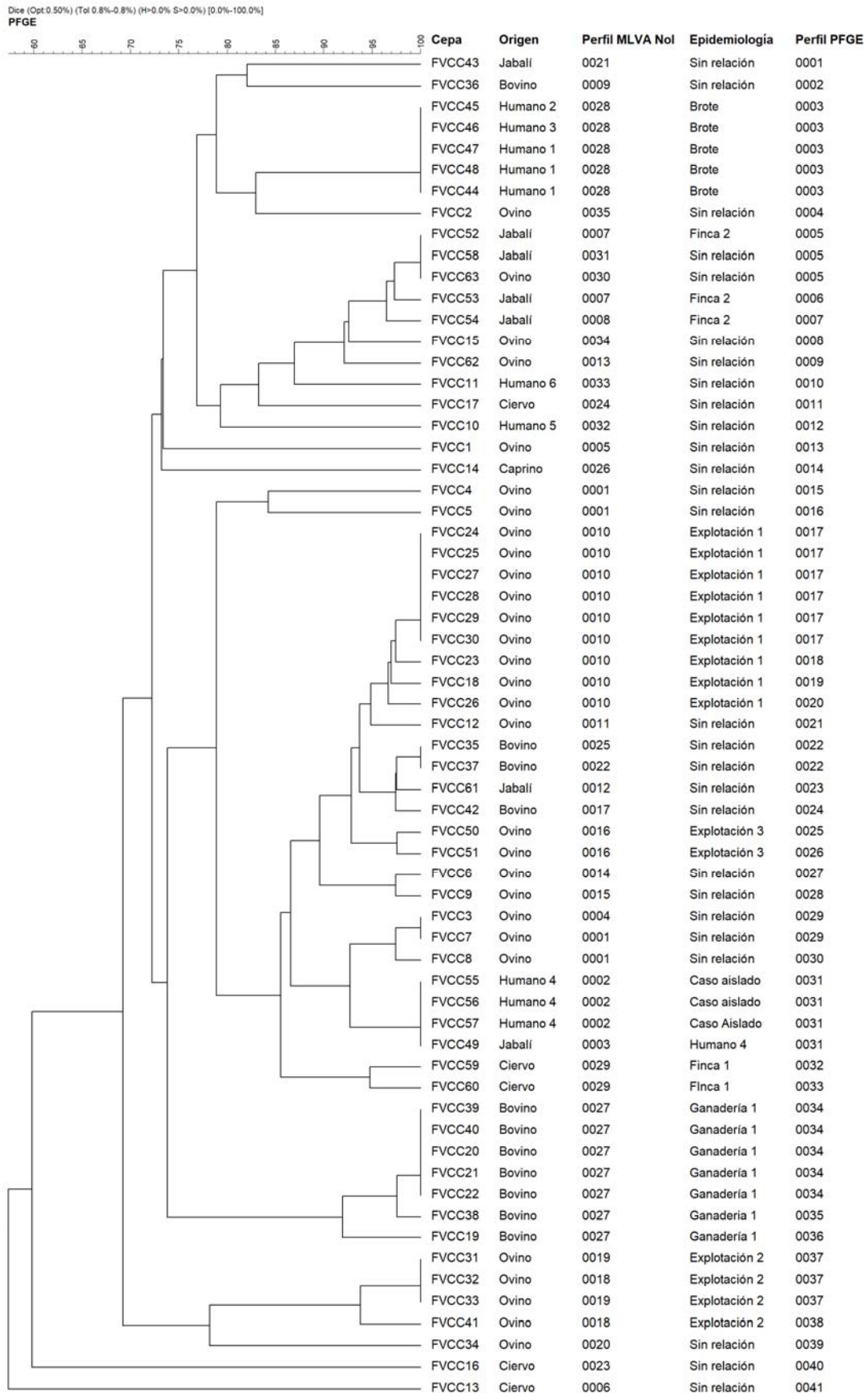


Ilustración 12. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los nueve aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 1 con el protocolo de la técnica de PFGE.

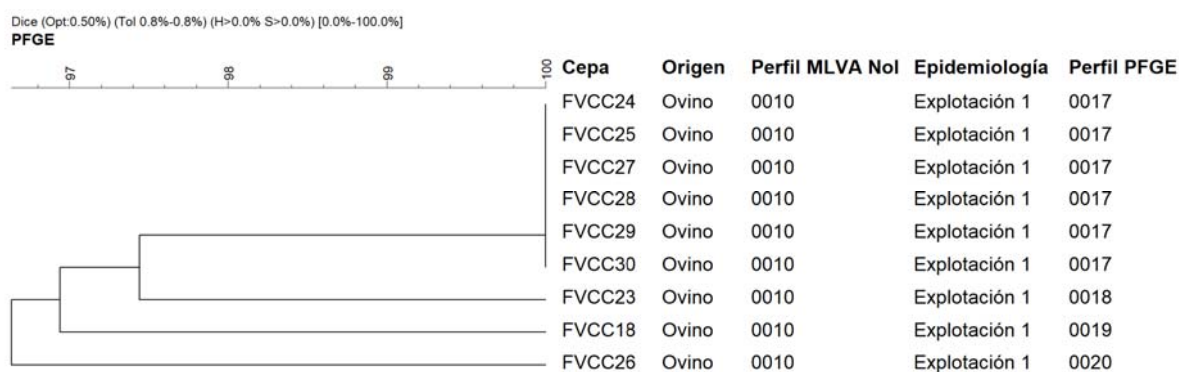


Ilustración 13. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los dos aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 3 con el protocolo de la técnica de PFGE.

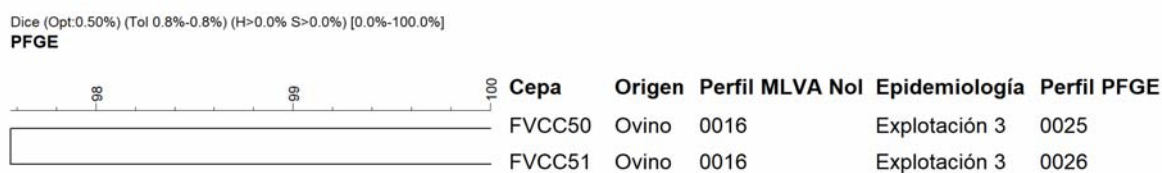
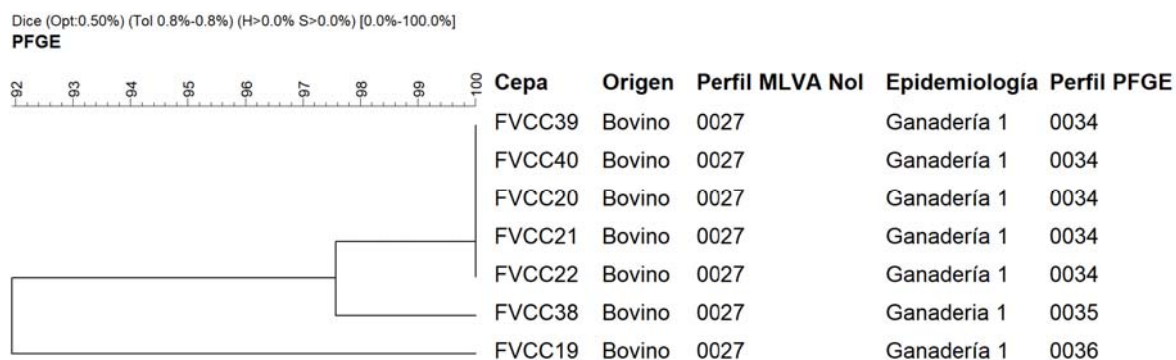


Ilustración 14. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los siete aislados de *E. coli* O157:H7 de origen bovino estudiados de la ganadería 1 con el protocolo de la técnica de PFGE.



Resultados

Ilustración 15. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de los dos aislados de *E. coli* O157:H7 procedentes de ciervos estudiados de la finca 1 con el protocolo de la técnica de PFGE.



Ilustración 16. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) de los cinco aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados en pacientes hospitalizados con gastroenteritis.



Ilustración 17. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) de los tres aislados de *E. coli* O157:H7 de origen humano y un aislado de origen suido estudiados.

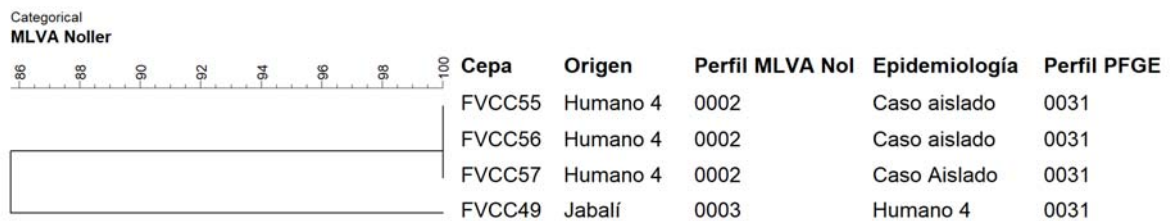


Ilustración 18. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y en el coeficiente de Dice (PFGE) de los cuatro aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 2.

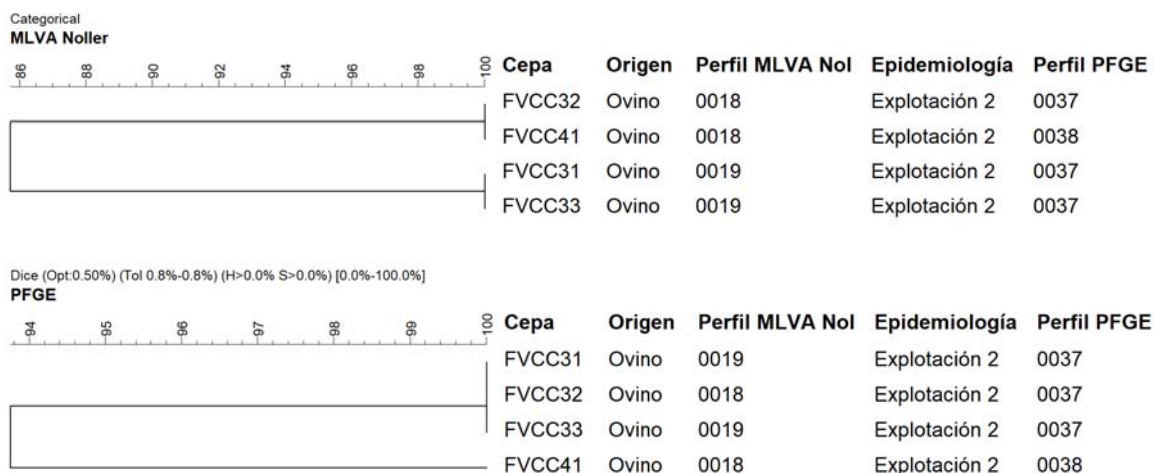
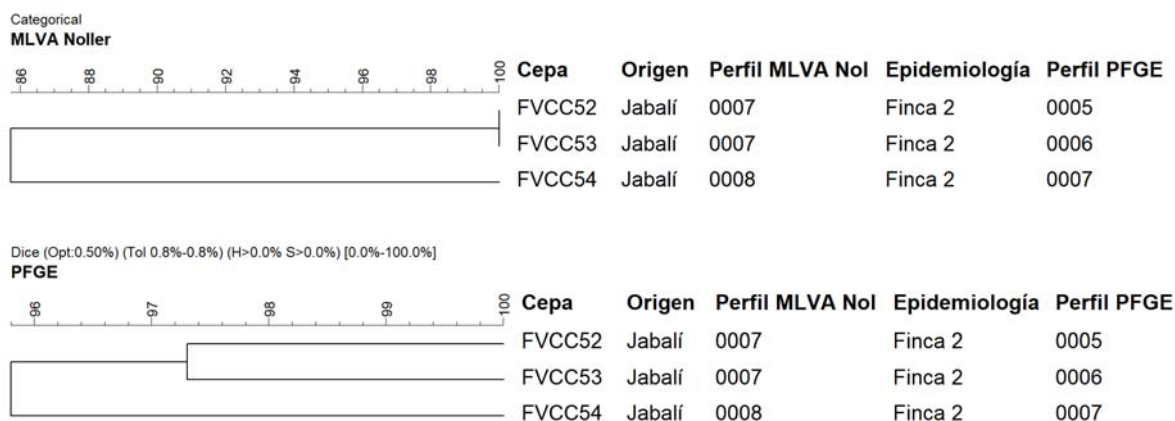


Ilustración 19. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y en el coeficiente de Dice (PFGE) de los tres aislados de *E. coli* O157:H7 de origen suido estudiados de la finca 2.



Resultados

Ilustración 20. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller et al. (2003) correspondiente a los 27 aislados de *E. coli* O157:H7 sin relación epidemiológica conocida.

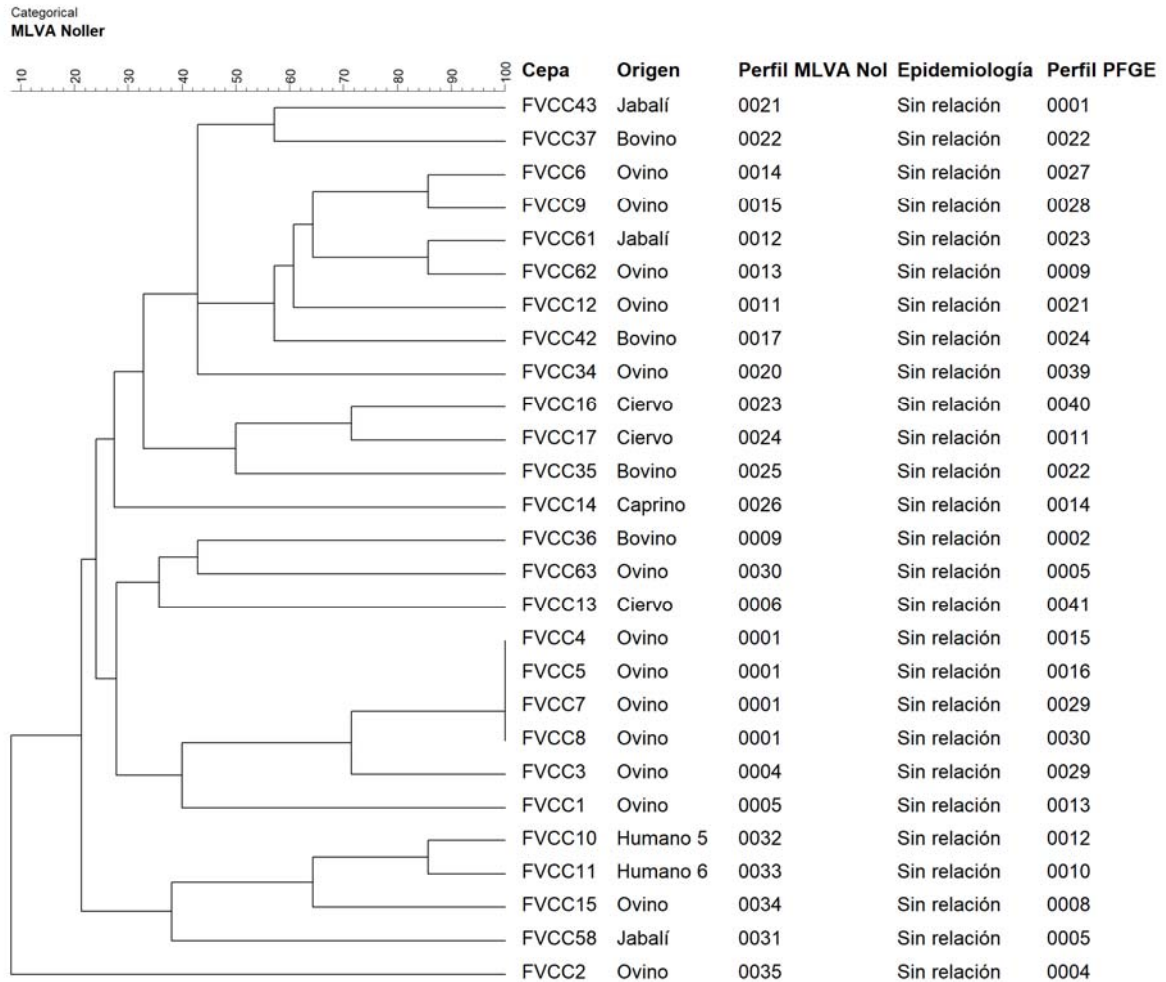
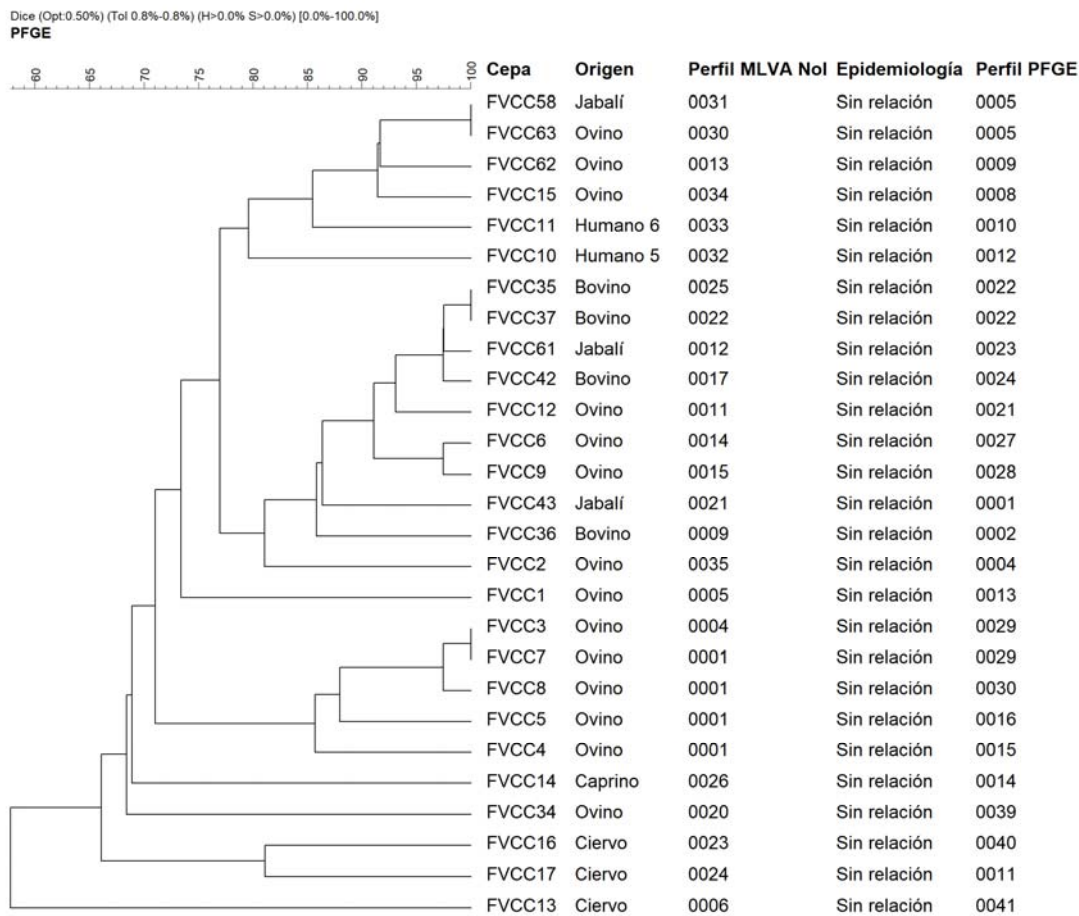


Ilustración 21. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice correspondiente a los 27 aislados de *E. coli* O157:H7 sin relación epidemiológica conocida con el protocolo de la técnica de PFGE.



Resultados

Ilustración 22. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y en el coeficiente de Dice (PFGE) de cuatro aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino, tres aislados de origen humano y un aislado procedente de jabalí.

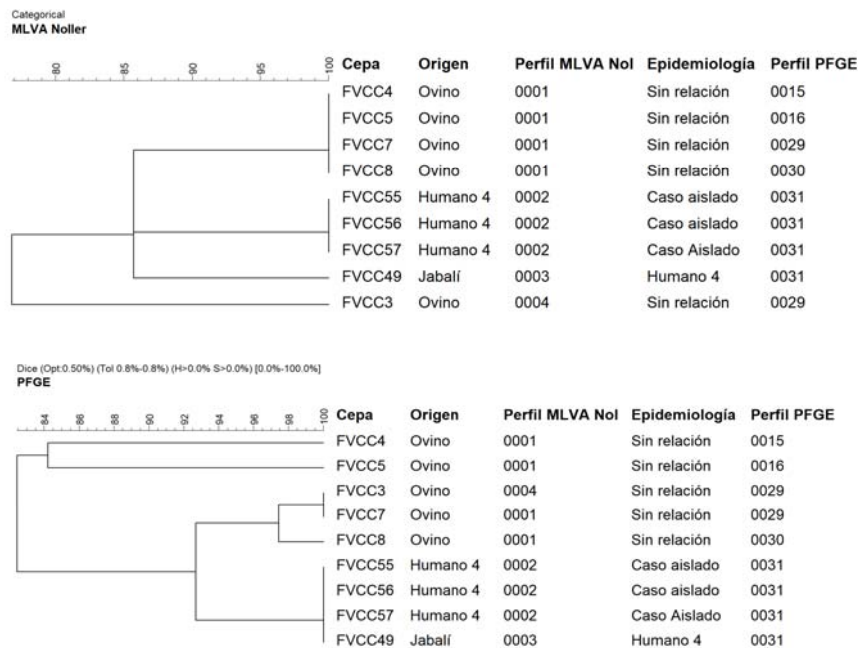
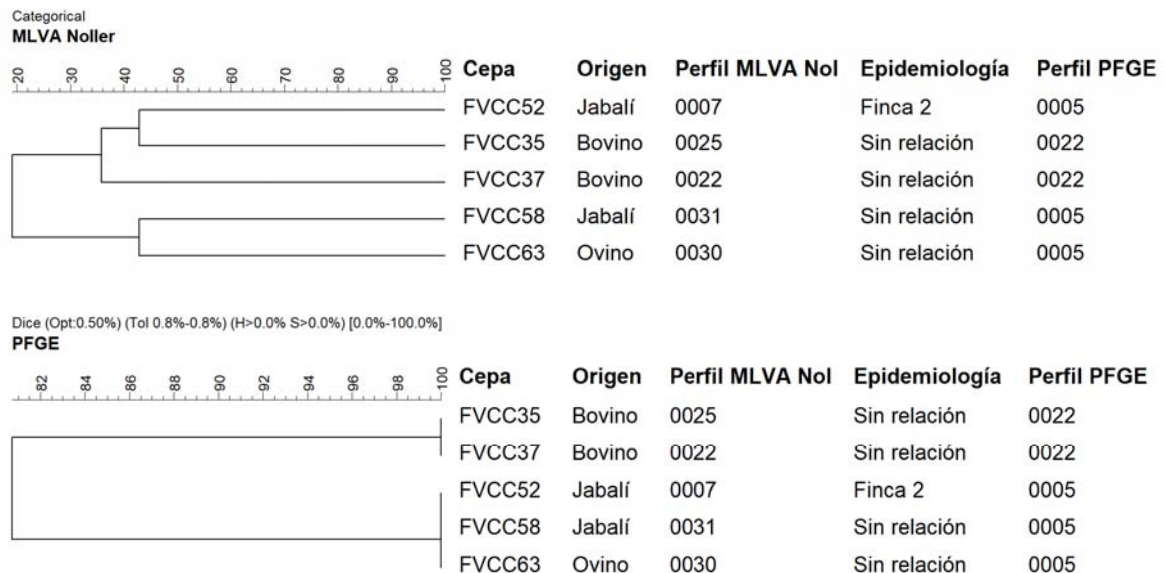


Ilustración 23. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y en el coeficiente de Dice (PFGE) de cuatro aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino, tres aislados de origen humano y un aislado procedente de jabalí.



4.2. Subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7 mediante la técnica de MLVA con el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007)

Como ya se ha comentado en el punto **3.5 del Materiales y Métodos**, los productos de PCR obtenidos con la cepa control EDL933 fueron secuenciados y los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 14**. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Lindstedt *et al.* (2007) a partir de la secuencia del genoma completo de la cepa EDL933 (número de acceso a GenBank: AE005174). El aislado de la cepa EDL933 empleado en el laboratorio mostró una repetición menos en la VNTR CVN001 y 22 repeticiones menos en CVN004.

Tabla 14. Número de repeticiones en tándem y tamaño del producto de electroforesis capilar obtenidos en cada VNTR aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) con la cepa EDL933.

Referencia	Nº de repeticiones en tándem / Tamaño de producto de electroforesis capilar (pb)													
	CVN001		CVN002		CVN003		CVN004		CVN007		CVN014		CVN015	
EDL933	6	477	12	446	4	433	7	311	14	392	6	137	10	230

Tal y como se ha explicado en el punto **3.5 del Materiales y Métodos**, a partir de los resultados obtenidos con la cepa EDL933, se estimaron las repeticiones en tándem del resto de aislados analizados. El tamaño de los productos de PCR obtenidos y su conversión en alelos se exponen en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Conversión en alelos de los productos de PCR obtenidos en la electroforesis capilar aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007), tomando como referencia los productos obtenidos y secuenciados a partir de la cepa EDL933.

Nº de repeticiones	Tamaños de producto de electroforesis capilar (pb)*						
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015
1			386-390				
2			401-405		318-322		
3		282-286	416-420		324-328	117-121	
4		300-304	431-435		330-334	123-127	
5	436-440	318-322	446-450		336-340	129-133	
6	475-479	336-340	461-465	294-298	342-346	135-139	204-208
7	514-516	352-358	476-480	309-313	348-352	141-145	210-214
8		372-376	491-495	324-328	354-358	147-151	216-220
9		390-394	506-510	339-343	360-364	153-157	222-226
10		408-412		354-358	366-370	159-163	228-232
11		426-430		369-373	372-376	165-169	234-238
12		444-448		384-388	378-382	171-175	
13		462-466		399-403	384-388	177-181	
14					390-394	183-187	
15					396-400	189-193	
16					402-406	195-199	
17					408-412	201-205	

Resultados

Nº de repeticiones	Tamaños de producto de electroforesis capilar (pb)*						
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015
18						207-211	
19						213-217	
20						219-223	
21						225-229	
22						231-235	
23						237-241	
24						243-247	
25						249-253	

* En negrita los productos obtenidos y secuenciados a partir de la cepa de referencia EDL933.

Se identificó un total de 26 perfiles entre todos los 63 aislados analizados con este protocolo (**Tabla 16**). Algunos de estos perfiles aglutinaron un gran número de aislados, como por ejemplo el perfil 4 con 9 aislados, mientras que otros perfiles únicamente incluyeron un aislado (**Ilustración 25**).

Tabla 16. Perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de *E. coli* O157:H7 aplicando el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007).

Referencia	Nº de repeticiones							Perfil de MLVA
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015	
FVCC1	6	10	6	9	15	9	10	20
FVCC2	6	9	2	9	13	9	10	25
FVCC3	6	9	5	7	15	7	10	12
FVCC4	6	9	5	7	15	7	10	12
FVCC5	6	9	5	7	15	7	10	12
FVCC6	6	11	6	7	14	14	10	5
FVCC7	6	9	5	7	15	7	10	12
FVCC8	6	9	5	7	15	7	10	12
FVCC9	6	11	6	7	14	14	10	5
FVCC10	6	10	8	13	14	4	10	13
FVCC11	6	10	8	13	14	4	10	13
FVCC12	6	11	6	7	14	10	10	6
FVCC13	6	11	3	7	14	5	7	8
FVCC14	6	9	4	9	14	9	10	24
FVCC15	6	10	3	9	12	9	10	15
FVCC16	6	11	4	9	15	12	10	26
FVCC17	6	11	4	9	15	12	10	26
FVCC18	6	11	6	7	14	16	10	4
FVCC19	6	10	5	9	16	6	10	21
FVCC20	6	10	5	9	16	6	10	21
FVCC21	6	10	5	9	16	6	10	21

Referencia	Nº de repeticiones							Perfil de MLVA
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015	
FVCC22	6	10	5	9	16	6	10	21
FVCC23	6	11	6	7	14	16	10	4
FVCC24	6	11	6	7	14	16	10	4
FVCC25	6	11	6	7	14	16	10	4
FVCC26	6	11	6	7	14	16	10	4
FVCC27	6	11	6	7	14	16	10	4
FVCC28	6	11	6	7	14	16	10	4
FVCC29	6	11	6	7	14	16	10	4
FVCC30	6	11	6	7	14	16	10	4
FVCC31	6	9	4	9	14	7	10	23
FVCC32	6	9	4	9	14	7	10	23
FVCC33	6	9	4	9	14	7	10	23
FVCC34	6	10	3	9	14	7	10	17
FVCC35	6	11	6	7	15	19	10	7
FVCC36	6	10	3	9	16	9	10	18
FVCC37	6	11	6	7	14	14	10	5
FVCC38	6	10	5	9	16	6	10	21
FVCC39	6	10	5	9	16	6	10	21
FVCC40	6	10	5	9	16	6	10	21
FVCC41	6	9	4	9	14	7	10	23
FVCC42	6	11	5	7	14	18	10	1
FVCC43	6	11	5	7	14	18	10	1
FVCC44	6	9	6	9	16	6	10	22
FVCC45	6	9	6	9	16	6	10	22
FVCC46	6	9	6	9	16	6	10	22
FVCC47	6	9	6	9	16	6	10	22
FVCC48	6	9	6	9	16	6	10	22
FVCC49	6	10	5	7	15	11	10	11
FVCC50	6	11	6	7	14	15	10	3
FVCC51	6	11	6	7	14	15	10	3
FVCC52	6	10	3	9	12	7	10	14
FVCC53	6	10	3	9	12	7	10	14
FVCC54	6	10	3	9	12	7	10	14
FVCC55	6	10	4	7	15	11	10	10
FVCC56	6	10	4	7	15	11	10	10
FVCC57	6	10	4	7	15	11	10	10
FVCC58	6	10	3	9	12	8	10	16
FVCC59	6	10	4	7	15	16	10	9
FVCC60	6	10	4	7	15	16	10	9

Resultados

Referencia	Nº de repeticiones							Perfil de MLVA
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015	
FVCC61	6	11	5	7	14	12	10	2
FVCC62	6	11	6	7	14	14	10	5
FVCC63	6	10	3	9	12	8	8	19

Los IDs observados en cada una de las VNTR incluidas en este protocolo variaron entre 0 y 0.888 (CVN001 y CVN014 respectivamente) (**Tabla 17**). CVN14 presentó un total de 14 alelos distintos, aportando junto con CVN003 y CVN007 la mayor diversidad. El poder de discriminación de la técnica de MLVA con el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007) fue de 0.9488, con 26 perfiles distintos entre los 63 aislados estudiados (**Tabla 6 e Ilustración 24 y 25**), mientras que para la técnica de PFGE fue de 0.975, con 41 perfiles distintos (**Tabla 6 e Ilustración 26**).

Tabla 17. Características de las VNTR y resultados obtenidos en los aislados de *E. coli* O157:H7 aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007).

VNTR	Tamaño (pb)	Secuencia repetitiva 5' – 3'	Nº de repeticiones		Nº alelos*	Alelos nulos	ID**
			Mínimo	Máximo			
CVN001	39	CAGCAGCCGCAACAACCGGTTGCGCCGAGCAGCAATAT	6	6	1	-	0
CVN002	18	TTAAATAATCCACAGGAG	9	11	3	-	0.668
CVN003	15	TGCTACCCCGGACGG	2	8	6	-	0.756
CVN004	15	AGCAGCAAAAGCGGC	7	13	3	-	0.538
CVN007	6	ACCACG	12	16	5	-	0.705
CVN014	6	TGCAGG	4	19	14	-	0.888
CVN015	6	CATCAC	7	10	3	-	0.063

* Número de alelos contando la presencia de alelos nulos.

** ID: índice de diversidad sin considerar la presencia de alelos nulos.

Los criterios empleados para el análisis de los resultados de la técnica de MLVA obtenidos con este segundo protocolo y de PFGE fueron los descritos en el punto **4.1 de Resultados**. De nuevo, el análisis de los resultados se llevó a cabo considerando globalmente los 63 aislados objeto de estudio (**Ilustración 24-26**) y considerando de forma separada los 36 aislados con información epidemiológica disponible (**Tabla 6, Ilustración 27-34**) por un lado y los 27 aislados sin información epidemiológica disponible (**Tabla 6, Ilustración 35-39**) por otro.

De una parte, al considerar los aislados con información epidemiológica disponible, se observó que todos los aislados pertenecientes a una misma explotación (**Ilustración 27, 28 y 29**), ganadería (**Ilustración 30**) o finca (**Ilustración 31 y 32**), presentaron perfiles de MLVA indistinguibles entre ellos. Al comparar los resultados con los obtenidos mediante PFGE (**Ilustraciones 26 a 32**), aunque con esta técnica se obtuvo un mayor número de perfiles, en todos los casos éstos mostraron siempre diferencias de entre 1 y 3 fragmentos de restricción (> 91% de similaridad). Este es el caso, por ejemplo, de la explotación 1 (**Ilustración 27**), donde aislados con un solo perfil de MLVA (perfil 0004), presentaron hasta cuatro perfiles distintos de PFGE (0017, 0018, 0019 y 0020) aunque con una alta similaridad entre todos ellos (96.6% de similaridad).

De igual forma, entre los cinco aislados obtenidos de tres pacientes implicados en un brote de infección hospitalizados en un intervalo de aproximadamente 15 días (**Ilustración 33**) se observó un solo perfil de MLVA (perfil 0022). Tres de los aislados (FVCC44, FVCC47 y FVCC48) procedían del mismo paciente y fueron obtenidos a partir de muestras tomadas secuencialmente con varios días de diferencia. Este mismo hecho se apreció entre los aislados FVCC55, FVCC56 y FVCC57 (perfil 0010), procedentes de un caso esporádico de infección, obtenidos a partir de muestras del paciente tomadas también de manera secuencial (**Ilustración 34**). Además, al comparar este perfil (6-10-4-7-15-11-10) con los del resto de la colección, se identificaron dos perfiles [perfil 0011 (6-10-5-7-15-11-10) y perfil 009 [6-10-4-7-15-16-10]] con una SLV de diferencia. El perfil 0011, con una SLV consistente en una repetición más en CVN003, correspondió a un aislado (FVCC49) obtenido a partir de las heces de un jabalí abatido un mes antes en la misma área de salud (**Tabla 6**). El perfil 0009, con una SLV consistente en cinco repeticiones más en CVN014, correspondió con dos aislados obtenidos a partir de heces de ciervos abatidos en una finca de caza (Finca 1), pero sin relación epidemiológica conocida con los aislados del caso y del jabalí abatido. En ambas situaciones (brote y caso esporádico de infección y aislado del jabalí abatido), los aislados anteriormente mencionados mostraron perfiles de PFGE indistinguibles, salvo en el caso de los aislados de la Finca 1, que se diferenciaron en dos fragmentos de restricción entre ellas (94.7% de similaridad), y en más de tres fragmentos de restricción con respecto a los aislados del caso y el aislado del jabalí (84.8% de similaridad) (**Ilustración 33 y 34**).

Resultados

De otra parte, al considerar los aislados sin información epidemiológica disponible, empleando la técnica de MLVA con el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007) se obtuvo un menor número de perfiles con respecto a la técnica de PFGE (17 frente a 24), ya que la técnica de MLVA con este protocolo agrupaba en un mismo perfil aislados con perfiles de PFGE con diferencias de hasta siete fragmentos de restricción (> 81.1% similaridad) y sin relación epidemiológica conocida. Éste es el caso, por ejemplo, de los aislados FVCC42 y FVCC43, cuyo perfil de MLVA resultó indistinguible (perfil 0001) aunque los aislados se obtuvieron a partir de una vaca y un jabalí, respectivamente, en dos Comunidades Autónomas distintas (Cáceres y Madrid) (**Tabla 6**) y sus perfiles de PFGE se diferenciaron hasta en cinco fragmentos de restricción (87.2% de similaridad) (**Ilustración 37**). En otro ejemplo de la misma situación, los aislados FVCC6, FVCC9, FVCC37 y FVCC62 presentaron un perfil de MLVA indistinguible (perfil 0005) (**Ilustración 38**) aunque se obtuvieron a partir de animales (ganado ovino, a excepción del FVCC37, de origen bovino) situados en localizaciones muy distantes (**Tabla 6**) y sus perfiles de PFGE se diferenciaron hasta en cinco fragmentos de restricción (88.2% de similaridad). De igual forma, los aislados ovinos FVCC3, FVCC4, FVCC5, FVCC7 y FVCC8 presentaron un perfil de MLVA indistinguible (perfil 0012) (**Ilustración 39**) pese a no tener ningún vínculo espacial ni temporal y presentar cuatro perfiles de PFGE con hasta cuatro fragmentos de restricción de diferencia entre ellos.

Ilustración 24. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 63 aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007).

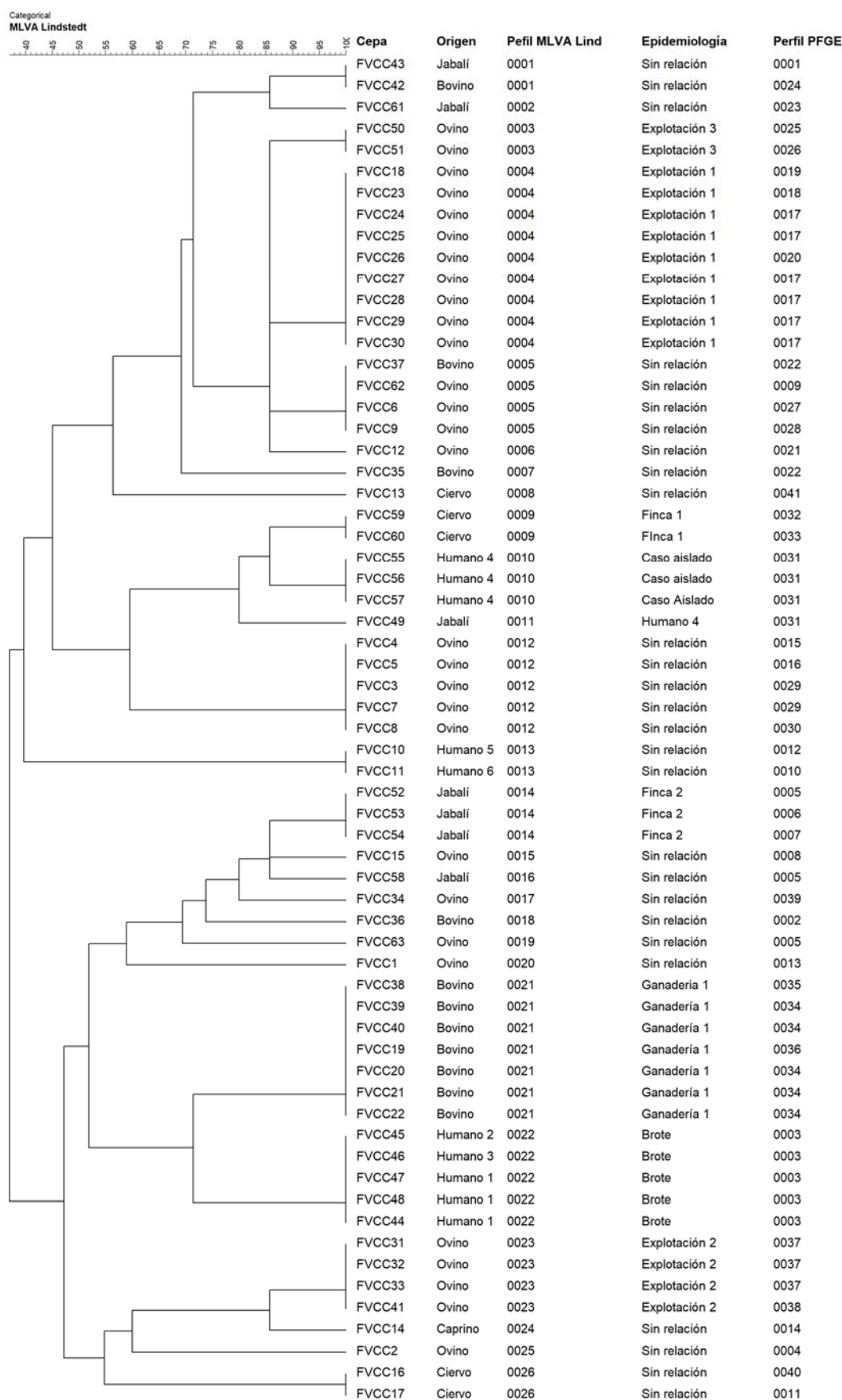
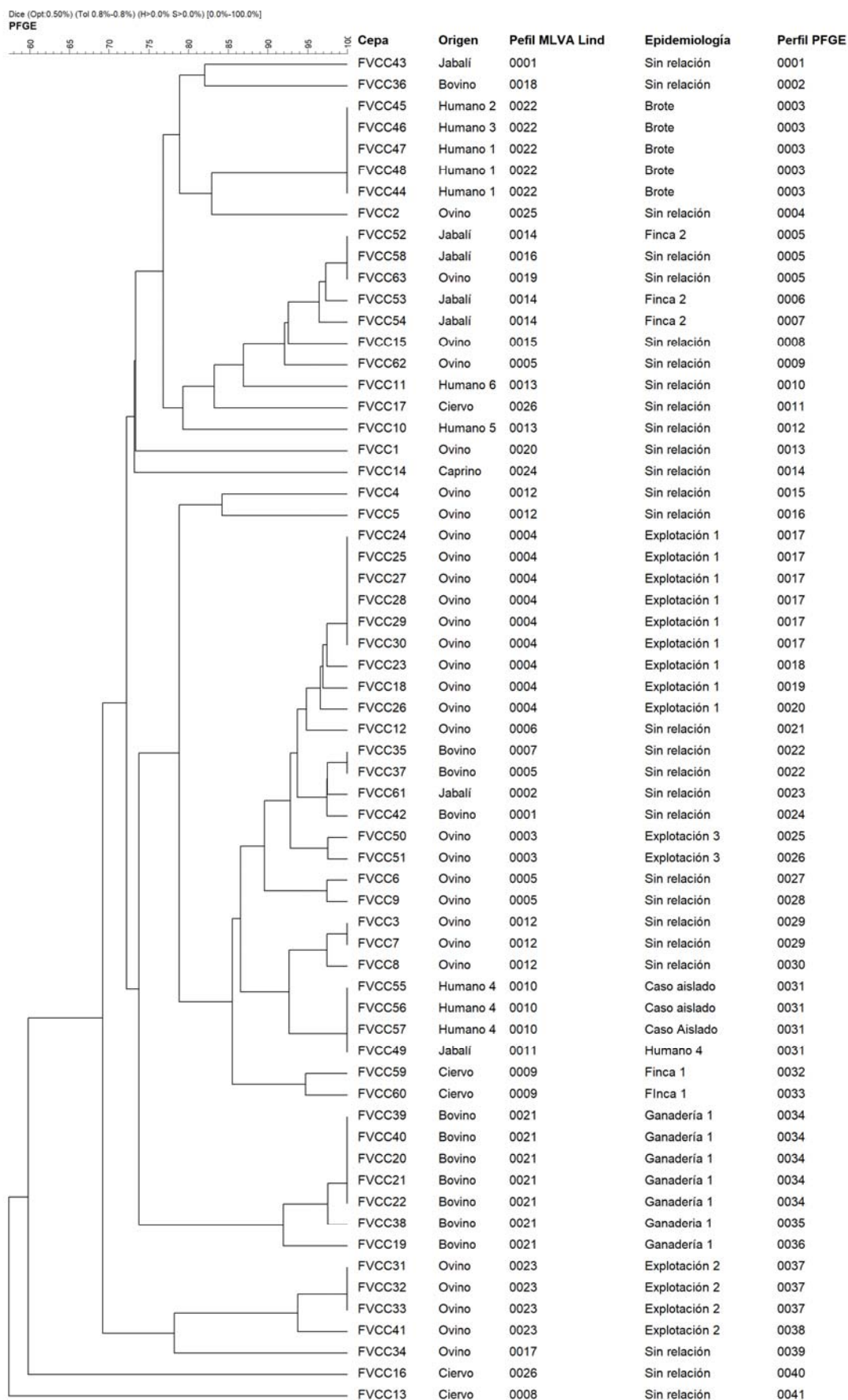


Ilustración 26. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice correspondiente a los 63 aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados con el protocolo de PFGE.



Resultados

Ilustración 27. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los nueve aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 1 con el protocolo de PFGE.

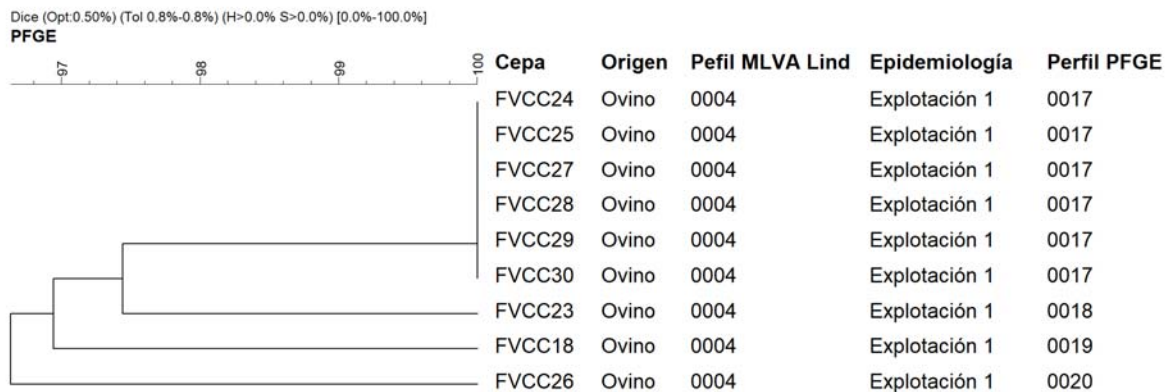


Ilustración 28. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los cuatro aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 2 con el protocolo de PFGE.

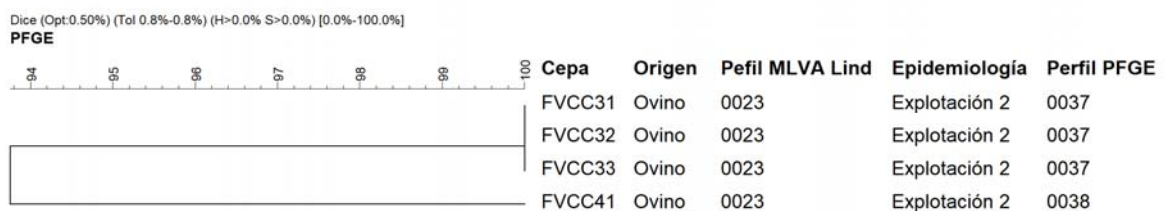


Ilustración 29. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de dos aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino estudiados de la explotación 3 con el protocolo de PFGE.



Ilustración 30. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice de los siete aislados de *E. coli* O157:H7 de origen bovino estudiados de la ganadería 1 con el protocolo de PFGE.

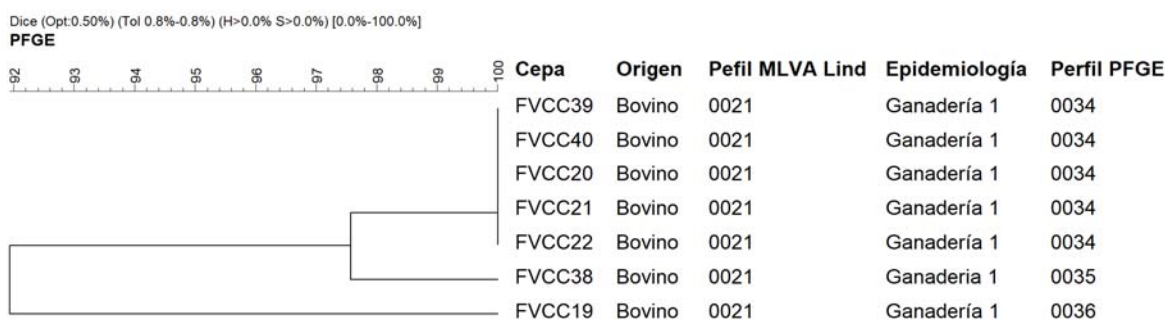


Ilustración 31. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de dos aislados de *E. coli* O157:H7 procedentes de ciervo estudiados de la finca 1 con el protocolo de PFGE.

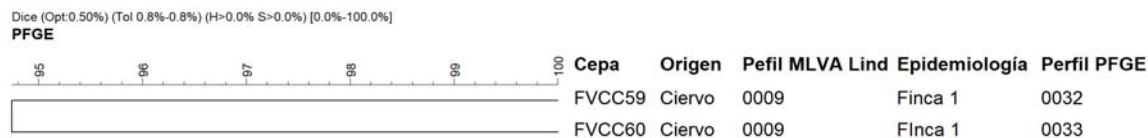


Ilustración 32. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de tres aislados de *E. coli* O157:H7 procedente de jabalí estudiados de la finca 2 con el protocolo de PFGE.

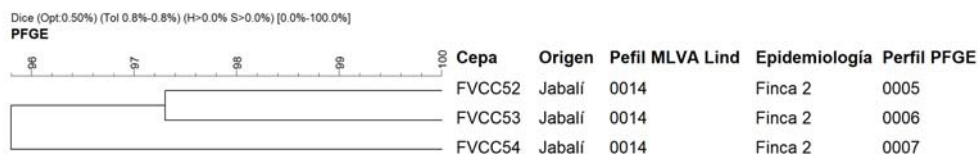
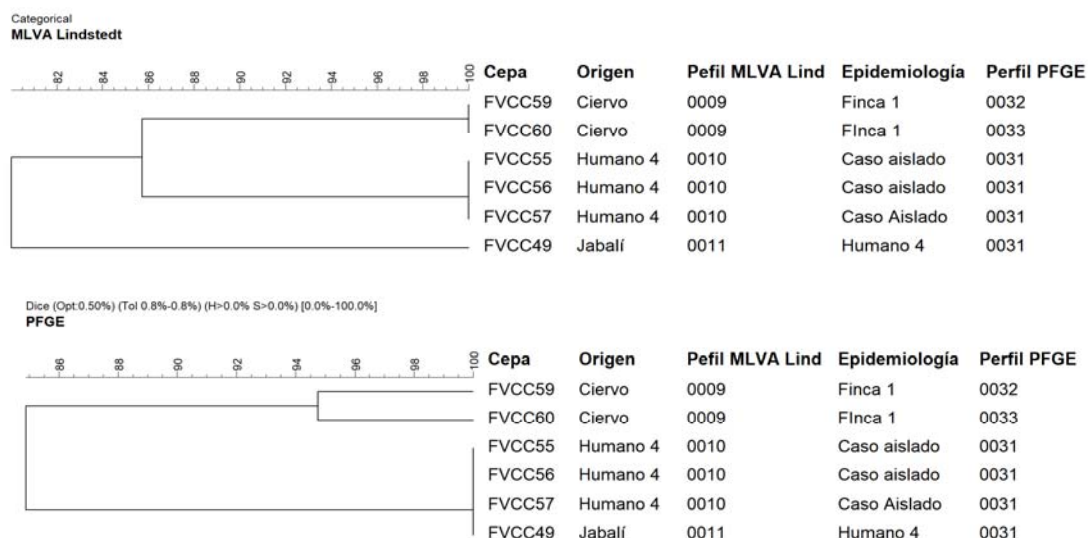


Ilustración 33. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) de los cinco aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados en pacientes hospitalizados con gastroenteritis.



Ilustración 34. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de similaridad de Dice (PFGE) de tres aislados de *E. coli* O157:H7 de origen humano, un aislado procedente de jabalí y dos procedentes de ciervo estudiados.



Resultados

Ilustración 35. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) correspondiente a los 27 aislados de *E. coli* O157:H7 sin relación epidemiológica conocida.

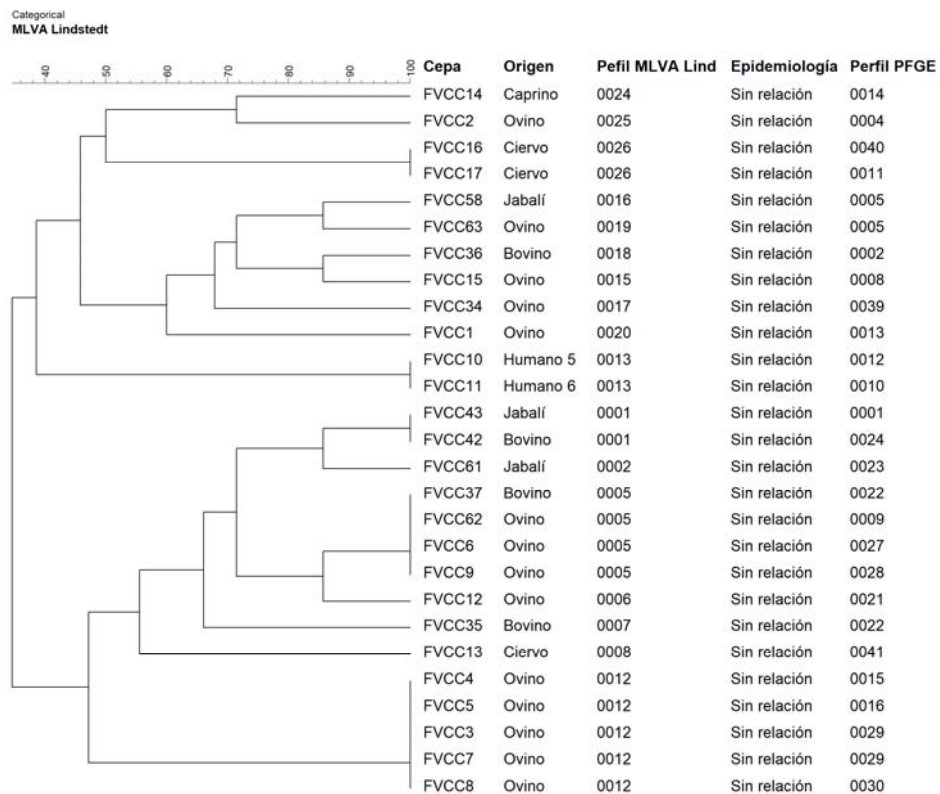


Ilustración 36. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice correspondiente a los 27 aislados de *E. coli* O157:H7 sin relación epidemiológica conocida con el protocolo de PFGE.

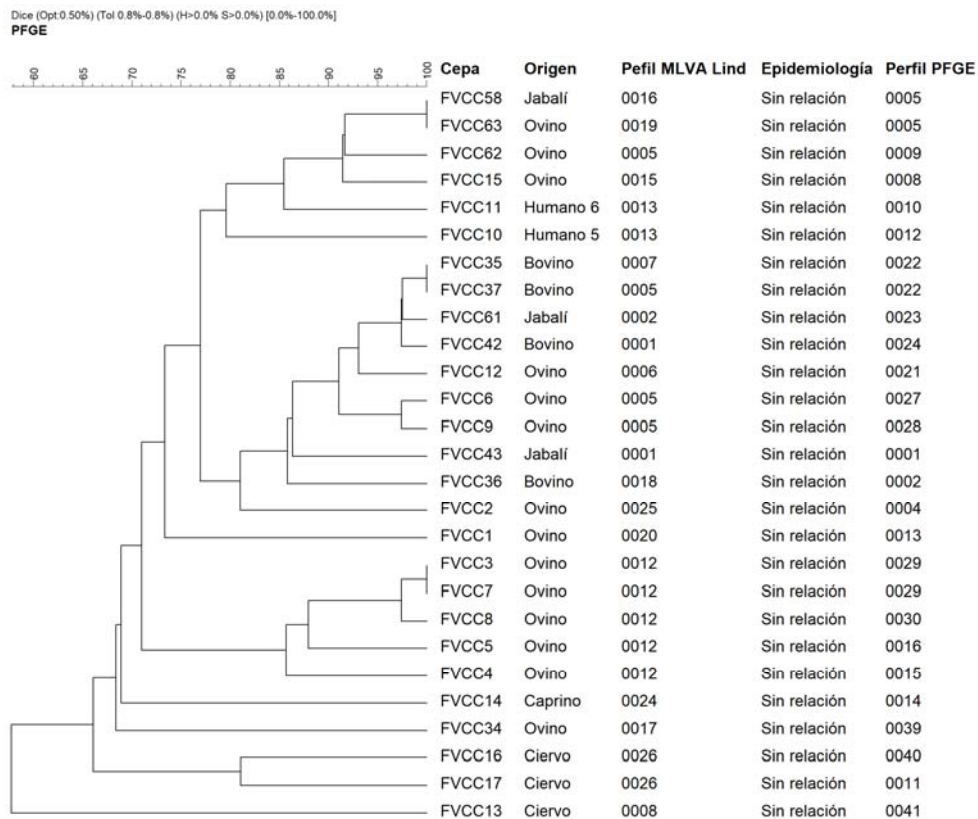


Ilustración 37. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Dice de dos aislados de *E. coli* O157:H7 sin relación epidemiológica procedentes de ganado bovino y jabalí con el protocolo de PFGE.



Ilustración 38. Dendrogramas basado en el coeficiente de Dice (PFGE) de cuatro aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino y bovino.

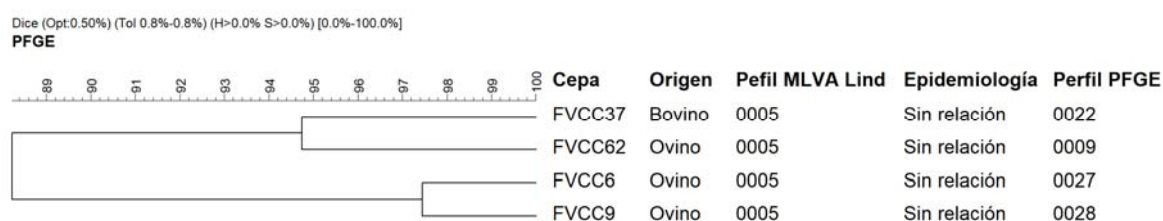
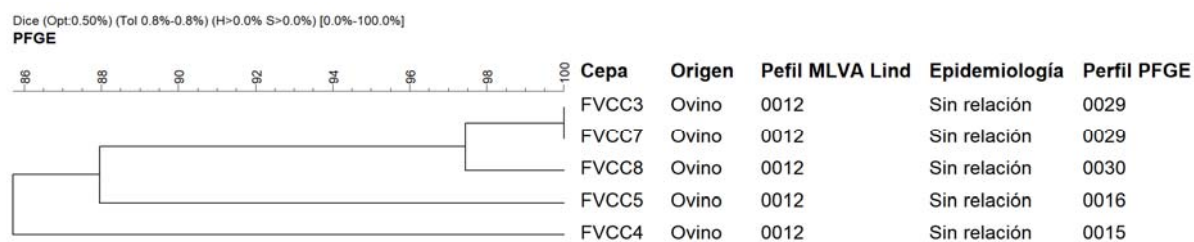


Ilustración 39. Dendrograma basado en el coeficiente de Dice (PFGE) de cinco aislados de *E. coli* O157:H7 de origen ovino.



4.3. Análisis combinado de los resultados obtenidos para la subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7 con todas las técnicas empleadas

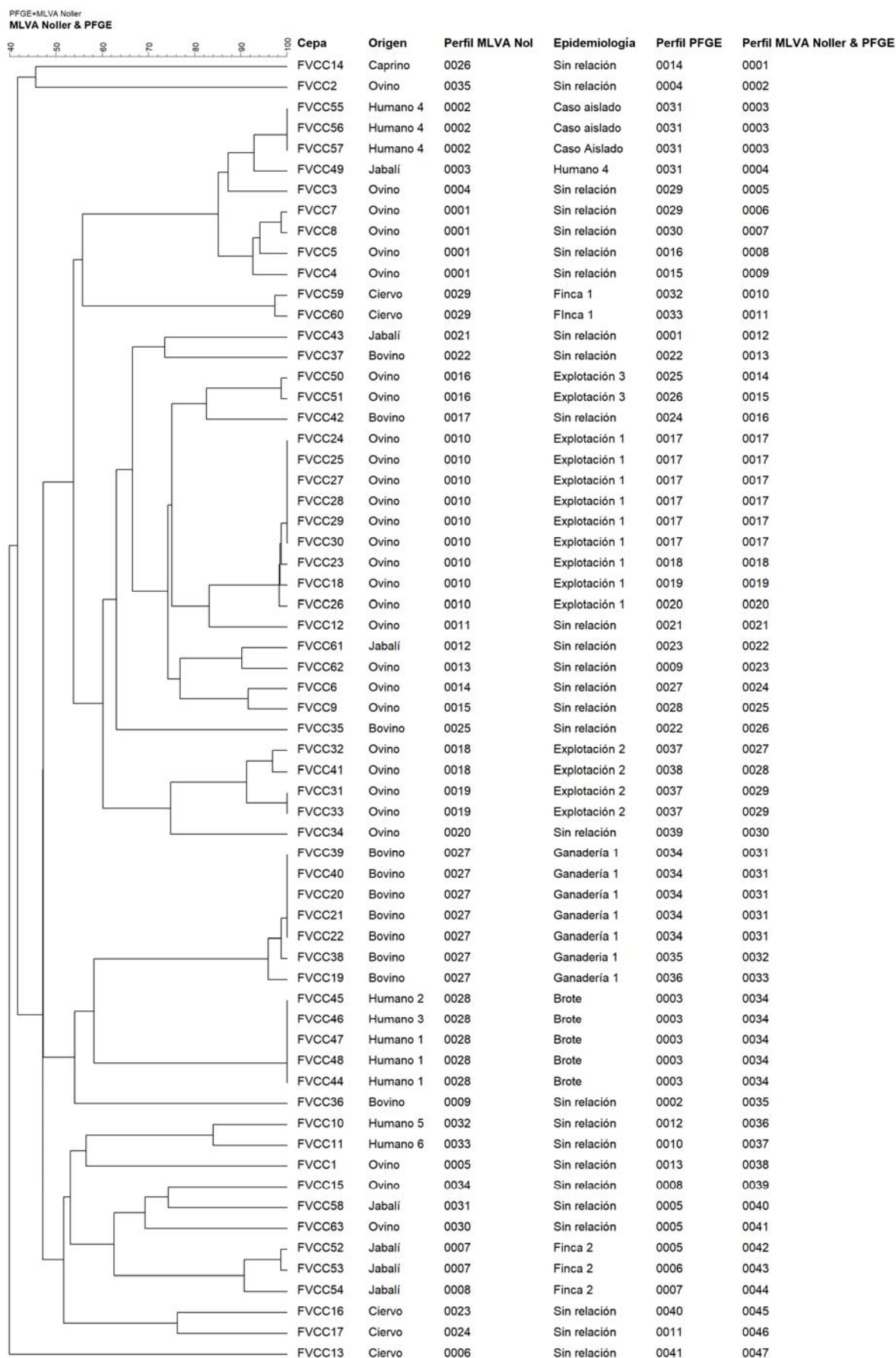
4.3.1. Subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7 combinando el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) con la técnica de PFGE

Los resultados obtenidos combinando el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) con la técnica de PFGE pueden observarse en la **Ilustración 40**. Se identificó un total de 47 perfiles, lo que aumentó el poder de discriminación de cada técnica por separado hasta 0.98. Como ya se ha comentado al analizar los resultados obtenidos con cada técnica por separado, los aislados de *E. coli* O157:H7 con información epidemiológica disponible fueron clasificados de manera congruente con ambas técnicas, por lo que en este caso el análisis combinado no supuso ninguna mejora en la clasificación de estos aislados.

Sin embargo, en el caso de los aislados de *E. coli* O157:H7 sin información epidemiológica disponible, el análisis combinado sí supuso una mejora en su clasificación con respecto a la obtenida con cada técnica por separado (**Ilustración 11**). Concretamente, ya no se observaron perfiles indistinguibles y aumentaron las diferencias en porcentaje de similitud entre aislados con y sin relación epidemiológica conocida. Por ejemplo, los tres aislados de la finca 2 (FVCC52, FVCC53 y FVCC54) se agruparon con una similitud del 90.8% (perfiles 0042, 0043 y 0044), separando de dicha agrupación a dos aislados sin relación epidemiológica conocida (FVCC58 y FVCC63) pero con un perfil indistinguible de PFGE (perfil 0005). Se observó además una reducción de la similitud con respecto a otros aislados sin relación epidemiológica conocida (FVCC11, FVCC15, FVCC17 y FVCC62).

No obstante, pese al análisis combinado persistió la duda relativa a la clasificación de los grupos de aislados FVCC3, FVCC4, FVCC5, FVCC7 y FVCC8, por un lado, FVCC61 y FVCC62, por otro, y FVCC6 y FVCC9, por otro, que, según los resultados obtenidos con cada técnica por separado presentaron una alta similitud.

Ilustración 40. Dendrograma basado en la media de los resultados obtenidos aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y técnica de PFGE correspondiente a los 63 aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados.



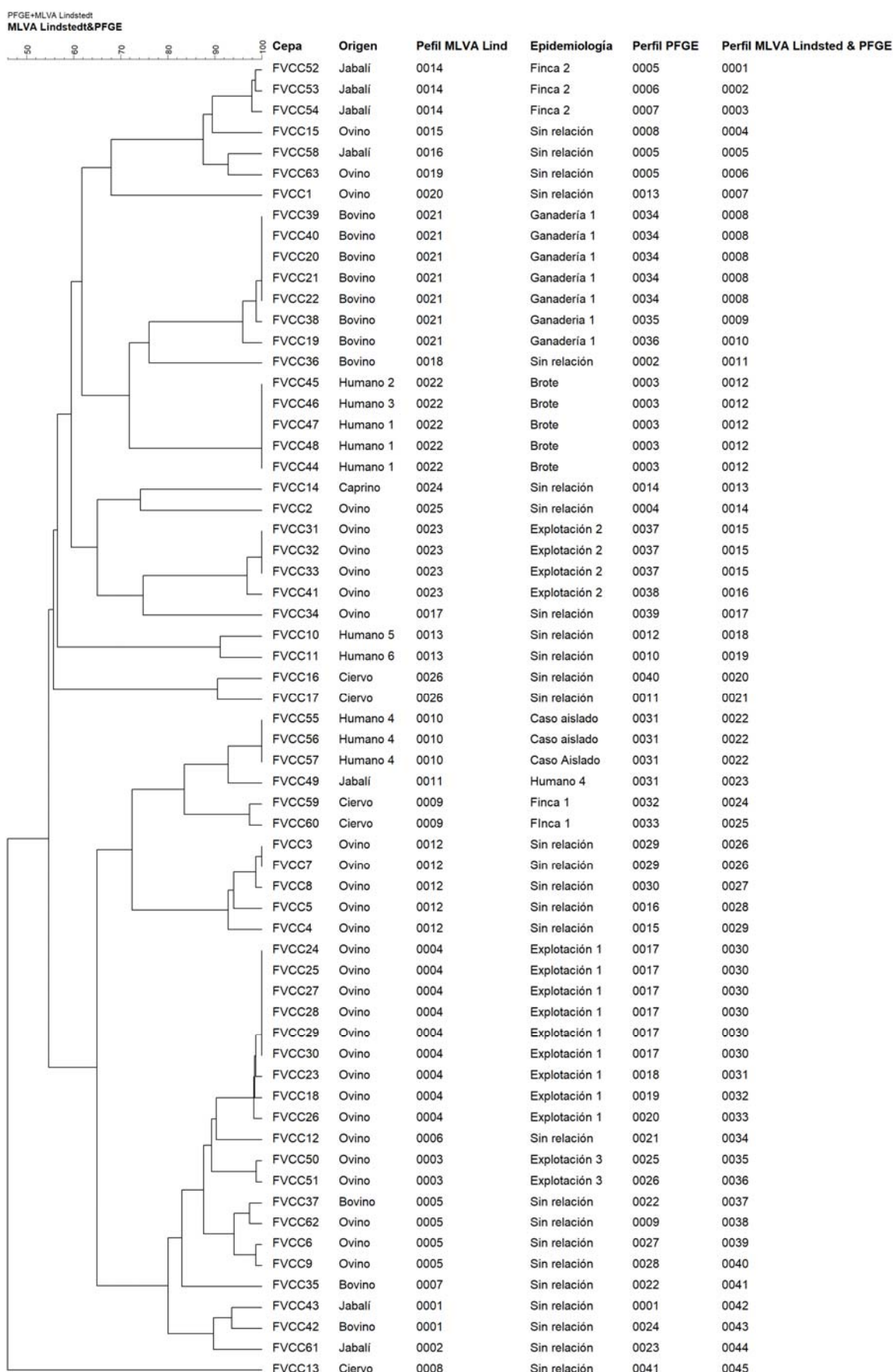
4.3.2. Subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7 combinando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) con la técnica de PFGE

Los resultados obtenidos combinando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) con la técnica de PFGE pueden observarse en la **Ilustración 41**. Se identificó un total de 45 perfiles, lo que aumentó el poder de discriminación de cada técnica por separado hasta 0,979. Como ya se ha comentado al analizar los resultados obtenidos con cada técnica por separado, de nuevo, los aislados de *E. coli* O157:H7 con información epidemiológica disponible fueron clasificados de manera congruente con ambas técnicas, por lo que en este caso el análisis combinado no supuso ninguna mejora en la clasificación de estos aislados.

Sin embargo, en el caso de los aislados de *E. coli* O157:H7 sin información epidemiológica disponible, el análisis combinado sí supuso una mejora en su clasificación con respecto a la obtenida con cada técnica por separado (**Ilustración 26**). Concretamente, al combinar ambas técnicas ya no se observaron perfiles indistinguibles y aumentaron las diferencias en porcentaje de similitud entre aislados con y sin relación epidemiológica conocida, si bien este aumento en los porcentajes de similitud fue menos acusado que en el apartado anterior, al combinar el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y la técnica de PFGE. Por ejemplo, los tres aislados de la finca 2 (FVCC52, FVCC53 y FVCC54) se agruparon con una similitud mayor del 97.9% (perfiles 0001, 0002 y 0003), separando también de dicha agrupación a dos aislados sin relación epidemiológica conocida (FVCC58 y FVCC63) pero con un perfil indistinguible de PFGE (perfil 0005). En este caso, el análisis combinado sólo permitió reducir la similitud con respecto al aislado FVCC15.

De nuevo, como ocurría en el punto anterior, pese al análisis combinado persistió la duda relativa a la clasificación de los aislados FVCC3, FVCC4, FVCC5, FVCC7 y FVCC8, que, según los resultados obtenidos con cada técnica por separado, presentaron una alta similitud. Lo mismo sucedió con otros grupos de aislados (FVCC10 y FVCC11, FVCC16 y FVCC17, FVCC37 y FVCC62, FVCC6 y FVCC9, FVCC43 y FVCC62), que presentaron una alta similitud en ausencia de información epidemiológica.

Ilustración 41. Dendrograma basado en la media de los resultados obtenidos aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y la técnica de PFGE correspondiente a los 63 aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados.



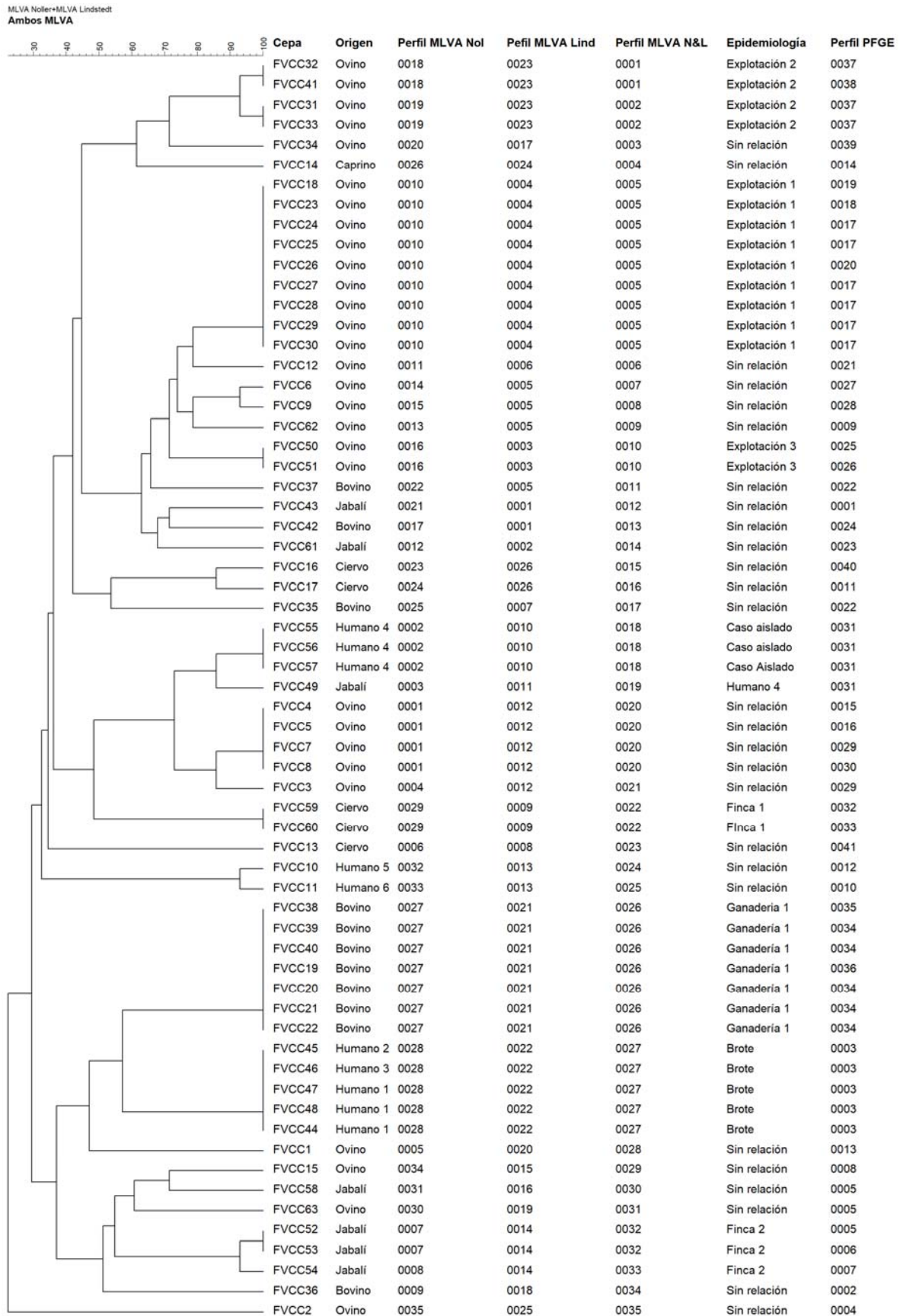
4.3.3. Subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7 combinando los protocolos de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y Lindstedt *et al.* (2007)

Los resultados obtenidos combinando los protocolos de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y Lindstedt *et al.* (2007) pueden observarse en la **Ilustración 42**. Se identificó un total de 35 perfiles, lo que redujo el poder de discriminación del protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) por separado, aunque aumentó ligeramente el del protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) por separado hasta 0.959. Como ya se ha comentado al analizar los resultados obtenidos con cada técnica por separado, de nuevo, los aislados de *E. coli* O157:H7 con información epidemiológica disponible fueron clasificados de manera congruente con ambas técnicas, por lo que en este caso el análisis combinado no supuso ninguna mejora en la clasificación de estos aislados.

Sin embargo, en el caso de los aislados de *E. coli* O157:H7 sin información epidemiológica disponible, el análisis combinado sí supuso una mejora en su clasificación con respecto a la obtenida con cada técnica por separado (**Ilustración 26**). Concretamente, al combinar ambas técnicas ya no se observaron perfiles indistinguibles y aumentaron las diferencias en porcentaje de similitud entre aislados con y sin relación epidemiológica conocida, si bien este aumento en los porcentajes de similitud fue menos acusado que en el **apartado 4.3.1**, al combinar el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y la técnica de PFGE. Por ejemplo, los tres aislados de la finca 2 (FVCC52, FVCC53 y FVCC54) se agruparon con una similitud mayor del 92.9% (perfiles 0032 y 0033), separando también de dicha agrupación a dos aislados sin relación epidemiológica conocida (FVCC58 y FVCC63) pero con un perfil indistinguible de PFGE (perfil 0005). En este caso, el análisis combinado sólo permitió reducir la similitud con respecto al aislado FVCC15.

De nuevo, como ocurría en el punto anterior, pese al análisis combinado persistió la duda relativa a la clasificación de los aislados FVCC3, FVCC4, FVCC5, FVCC7 y FVCC8, que, según los resultados obtenidos con cada técnica por separado, presentaron una alta similitud. Lo mismo sucedió con otros grupos de aislados (FVCC6 y FVCC9, FVCC10 y FVCC11, FVCC16 y FVCC17), que presentaron una alta similitud en ausencia de información epidemiológica.

Ilustración 42. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y Lindstedt *et al.* (2007) correspondiente a los 63 aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados.



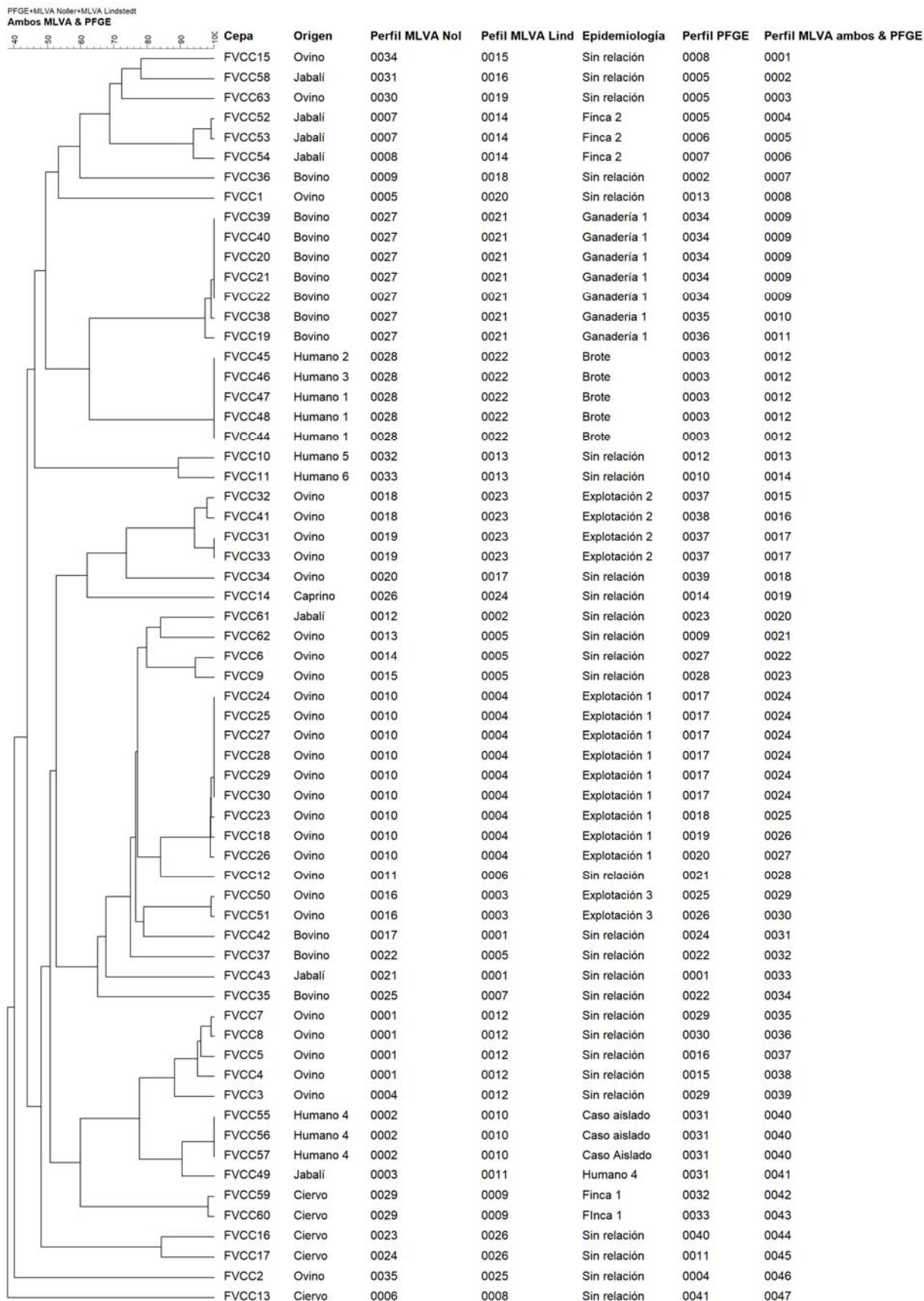
4.3.4. Subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7 combinando los protocolos de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y Lindstedt *et al.* (2007) y la técnica de PFGE

Los resultados obtenidos combinando los protocolos de Noller *et al.* (2003) y Lindstedt *et al.* (2007) con la técnica de PFGE pueden observarse en la **Ilustración 43**. Se identificó un total de 47 perfiles, lo que aumentó el poder de discriminación de cada técnica por separado hasta 0.98. Como ya se ha comentado al analizar los resultados obtenidos con cada técnica por separado, de nuevo, los aislados de *E. coli* O157:H7 con información epidemiológica disponible fueron clasificados de manera congruente con ambas técnicas, por lo que en este caso el análisis combinado no supuso ninguna mejora en la clasificación de estos aislados.

Sin embargo, en el caso de los aislados de *E. coli* O157:H7 sin información epidemiológica disponible, el análisis combinado sí supuso una mejora en su clasificación con respecto a la obtenida con cada técnica por separado (**Ilustración 26**). Concretamente, al combinar ambas técnicas ya no se observaron perfiles indistinguibles y aumentaron las diferencias en porcentaje de similaridad entre aislados con y sin relación epidemiológica conocida, si bien este aumento en los porcentajes de similaridad fue menos acusado que en el **apartado 4.3.1**, al combinar el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y la técnica de PFGE. Por ejemplo, los tres aislados de la finca 2 (FVCC52, FVCC53 y FVCC54) se agruparon con una similaridad mayor del 93.9% (perfiles 0004, 0005 y 0006), separando también de dicha agrupación a dos aislados sin relación epidemiológica conocida (FVCC58 y FVCC63) pero con un perfil indistinguible de PFGE (perfil 0005). En este caso, el análisis combinado sólo permitió reducir la similaridad con respecto al aislado FVCC15.

De nuevo, como ocurría en el punto anterior, pese al análisis combinado persistió la duda relativa a la clasificación de los aislados FVCC3, FVCC4, FVCC5, FVCC7 y FVCC8, que, según los resultados obtenidos con cada técnica por separado, presentaron una alta similaridad. Lo mismo sucedió con otros grupos de aislados (FVCC10 y FVCC11, FVCC6 y FVCC9, FVCC59 y FVCC60), que presentaron una alta similaridad en ausencia de información epidemiológica.

Ilustración 43. Dendrograma basado en la media de los resultados obtenidos aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) y Lindstedt *et al.* (2007) y la técnica de PFGE correspondiente a los 63 aislados de *E. coli* O157:H7 estudiados.



4.4. Subtipificación de aislados ECVT de los serogrupos O5, O91 y O146 mediante la técnica de MLVA con el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007)

El número de repeticiones en cada VNTR se estimó tal y como se ha explicado en el punto 4.2 de esta misma sección de **Resultados**. En total se identificaron 20 perfiles distintos entre los 115 aislados estudiados: 11 perfiles en ECVT O91, seis perfiles en ECVT O5 y cinco perfiles en ECVT O146. Las **Tablas 18, 19 y 20** muestran el número de repeticiones obtenido para cada aislado en cada una de las VNTR incluidas en este protocolo. Algunos de estos perfiles aglutinaron un gran número de aislados, como por ejemplo el perfil A4-C4 o el perfil A5 con 19 y 17 aislados respectivamente, mientras que otros perfiles únicamente incluyeron un aislado (**Ilustración 47**). No se obtuvo producto de PCR para la VNTR CVN003 en ninguno de los aislados.

Tabla 18. Perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de ECVT O5 aplicando el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007).

Referencia	Nº de repeticiones							Perfil de la técnica de MLVA*
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015	
FCVTEC31	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC33	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC42	6	4	0	12	10	15	7	C2
FCVTEC44	6	4	0	12	10	16	7	C1
FCVTEC45	6	4	0	12	10	16	7	C1
FCVTEC58	6	4	0	12	10	16	7	C1
FCVTEC59	6	4	0	12	10	16	7	C1
FCVTEC64	6	4	0	12	10	17	7	C6
FCVTEC68	6	4	0	12	10	18	7	C5
FCVTEC89	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC90	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC92	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC94	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC95	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC96	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC97	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC98	6	4	0	12	10	11	7	C3
FCVTEC99	6	4	0	12	10	10	7	C4
FCVTEC141	6	4	0	12	10	11	7	C3
FCVTEC142	6	4	0	12	10	11	7	C3
FCVTEC143	6	4	0	12	10	11	7	C3
FCVTEC144	6	4	0	12	10	11	7	C3
FCVTEC148	6	4	0	12	10	15	7	C2
FCVTEC149	6	4	0	12	10	15	7	C2

* En negrita, perfiles de la técnica de MLVA compartidos con aislados de ECVT O146.

Tabla 19. Perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de ECVT O91 aplicando el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007).

Referencia	Nº de repeticiones							Perfil de la técnica de MLVA
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015	
FCVTEC6	7	4	0	12	3	14	7	B7
FCVTEC7	7	4	0	12	3	13	7	B9
FCVTEC8	7	4	0	12	3	13	7	B9
FCVTEC11	7	4	0	12	3	14	7	B7
FCVTEC12	7	4	0	12	3	14	7	B7
FCVTEC13	7	4	0	12	3	14	7	B7
FCVTEC14	7	4	0	12	3	14	7	B7
FCVTEC15	7	4	0	12	3	14	7	B7
FCVTEC22	7	4	0	12	3	7	7	B2
FCVTEC23	7	4	0	12	3	7	7	B2
FCVTEC24	7	4	0	12	3	7	7	B2
FCVTEC36	7	4	0	12	3	12	7	B8
FCVTEC37	7	4	0	12	3	12	7	B8
FCVTEC38	7	4	0	12	3	12	7	B8
FCVTEC39	7	4	0	12	3	12	7	B8
FCVTEC49	7	4	0	12	3	9	7	B1
FCVTEC50	7	4	0	12	3	9	7	B1
FCVTEC62	7	4	0	12	3	9	7	B1
FCVTEC66	7	4	0	12	3	24	7	B6
FCVTEC67	7	4	0	12	3	24	7	B6
FCVTEC65	7	4	0	12	3	24	7	B6
FCVTEC69	7	4	0	12	3	24	7	B6
FCVTEC71	7	4	0	12	3	13	7	B9
FCVTEC73	7	4	0	12	3	6	7	B4
FCVTEC74	7	4	0	12	3	6	7	B4
FCVTEC75	7	4	0	12	3	6	7	B4
FCVTEC76	7	4	0	12	3	6	7	B4
FCVTEC77	7	4	0	12	3	6	7	B4
FCVTEC79	7	4	0	12	3	5	7	B5
FCVTEC80	7	4	0	12	3	5	7	B5
FCVTEC81	7	4	0	12	3	5	7	B5
FCVTEC82	7	4	0	12	3	8	7	B3
FCVTEC83	7	4	0	12	3	8	7	B3
FCVTEC84	7	4	0	12	3	5	7	B5
FCVTEC85	7	4	0	12	3	5	7	B5
FCVTEC86	7	4	0	12	3	5	7	B5
FCVTEC87	7	4	0	12	3	5	7	B5
FCVTEC91	7	4	0	12	3	13	7	B9
FCVTEC93	7	4	0	12	3	13	7	B9
FCVTEC100	7	4	0	7	3	11	7	B11
FCVTEC101	7	4	0	7	3	11	7	B11
FCVTEC102	7	4	0	7	3	11	7	B11
FCVTEC108	7	4	0	12	3	8	7	B3
FCVTEC109	7	4	0	12	3	8	7	B3
FCVTEC115	7	4	0	7	3	11	7	B11
FCVTEC116	7	4	0	7	3	11	7	B11
FCVTEC119	7	4	0	7	3	12	7	B10
FCVTEC120	7	4	0	7	3	12	7	B10

Resultados

Referencia	Nº de repeticiones							Perfil de la técnica de MLVA
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015	
FCVTEC121	7	4	0	7	3	12	7	B10
FCVTEC130	7	4	0	7	3	11	7	B11
FCVTEC131	7	4	0	7	3	11	7	B11
FCVTEC135	7	4	0	7	3	11	7	B11

Tabla 20. Perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de ECVT O146 aplicando el protocolo de Lindstedt et al. (2007).

Referencia	Nº de repeticiones							Perfil de MLVA*
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015	
FCVTEC1	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC2	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC3	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC4	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC5	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC19	6	4	0	12	10	10	7	A4
FCVTEC20	6	4	0	12	10	10	7	A4
FCVTEC21	6	4	0	12	10	10	7	A4
FCVTEC26	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC27	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC28	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC29	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC30	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC34	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC32	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC40	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC41	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC46	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC51	6	4	0	12	10	9	7	A3
FCVTEC55	6	4	0	12	10	9	7	A3
FCVTEC52	6	4	0	12	10	9	7	A3
FCVTEC53	6	4	0	12	10	9	7	A3
FCVTEC54	6	4	0	12	10	9	7	A3
FCVTEC112	6	4	0	12	10	10	7	A4
FCVTEC113	6	4	0	12	10	10	7	A4
FCVTEC114	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC117	6	4	0	12	10	4	7	A5
FCVTEC123	6	4	0	12	10	9	7	A3
FCVTEC124	6	4	0	12	10	9	7	A3
FCVTEC125	6	4	0	12	10	10	7	A4
FCVTEC126	6	4	0	12	10	10	7	A4
FCVTEC127	6	4	0	12	10	8	7	A2
FCVTEC128	6	4	0	12	10	10	7	A4
FCVTEC129	6	4	0	12	10	10	7	A4
FCVTEC132	6	4	0	12	10	8	7	A2
FCVTEC133	6	4	0	12	10	8	7	A2
FCVTEC136	6	4	0	12	10	8	7	A2
FCVTEC154	6	4	0	12	10	11	7	A1
FCVTEC155	6	4	0	12	10	11	7	A1

* En negrita, perfiles de la técnica de MLVA compartidos con aislados de ECVT O5.

Los IDs observados en cada una de las VNTR incluidas en este protocolo variaron entre 0 (CVN002 y CVN015) y 0.912 (CVN014) (**Tabla 21**). CVN014 presentó un total de 16 alelos distintos aportando la mayor diversidad, mientras que, como ya se ha comentado, no se consiguió amplificar CVN003 en ninguno de los aislados. El poder de discriminación de la técnica fue de 0.9275, con 20 perfiles distintos entre los 115 aislados estudiados (**Tablas 18, 19 y 20 e Ilustraciones 44, 45, 46 y 47**), mientras que para la técnica de PFGE fue de 0.975, con 54 perfiles distintos (**Tablas 7, 8 y 9 e Ilustraciones 48, 49 y 50**).

Tabla 21. Características de las VNTR y resultados obtenidos en los aislados de ECVT O5, O91 y O146 aplicando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007).

VNTR	Tamaño (pb)	Secuencia repetitiva 5' – 3'	Nº repeticiones		Nº alelos*	Alelos nulos	ID**
			Mínimo	Máximo			
CVN001	39	CAGCAGCCGCAACAACCGGTTGCGCCGCGCAGCAATAT	6	7	2	-	0.500
CVN002	18	TTAAATAATCCACAGGAG	4	4	1	-	0
CVN003	15	TGCTACCCCGGACGG	-	-	-	+	-
CVN004	15	AGCAGCAAAAGCGGC	7	12	2	-	0.175
CVN007	6	ACCACG	3	10	2	-	0.500
CVN014	6	TGCAGG	4	24	16	-	0.912
CVN015	6	CATCAC	7	7	1	-	0

* Número de alelos contando la presencia de alelos nulos.

** ID: índice de diversidad sin considerar la presencia de alelos nulos.

Los criterios empleados en el análisis de los resultados de las técnicas de MLVA y PFGE fueron los ya descritos en el punto **4.1 de Resultados**. De acuerdo con la bibliografía consultada, tal y como se ha expuesto anteriormente, el criterio que se aplicó para el análisis de los resultados de la técnica de MLVA fue considerar como aislados con un origen común, o pertenecientes a un mismo clon, aquéllos cuyos perfiles presentaban variaciones de una o varias repeticiones en una sola VNTR (SLV) o incluso en dos (DLV), además de información epidemiológica que lo apoyara. En el caso de la técnica de PFGE, empleada como referencia en el análisis, de acuerdo con los criterios de Tenover *et al.* (1995) y Barrett *et al.* (2006), se consideraron como aislados con un origen común, o pertenecientes a un mismo clon, aquéllos cuyos perfiles presentaban diferencias de hasta tres fragmentos de restricción, además de información epidemiológica que lo apoyara.

El protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* en 2007 tan sólo permitió clasificar en un solo clúster los aislados de ECVT O91, ya que como puede observarse en la **Tabla 22 e Ilustración 47**, dos perfiles de la técnica de MLVA de aislados de ECVT O5 fueron indistinguibles de los obtenidos en aislados de ECVT O146 (C4-A4 y C3-A1). Por el contrario, esta situación no se

Resultados

dio al estudiar los mismos aislados mediante la técnica de PFGE, que clasificó en distintos clústeres los aislados de cada serogrupo.

Tabla 22. Número de aislados, distribución de alelos y perfiles de la técnica de MLVA asignados a los aislados de ECVT O5, O91 y O146 aplicando el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007).

Serogrupo	Nº de aislados	Secuencia de alelos	Perfil de la técnica de MLVA
O5	10	6-4-0-12-10-10-7	C4
	5	6-4-0-12-10-11-7	C3
	3	6-4-0-12-10-15-7	C2
	4	6-4-0-12-10-16-7	C1
	1	6-4-0-12-10-17-7	C6
	1	6-4-0-12-10-18-7	C5
O91	8	7-4-0-7-3-11-7	B11
	3	7-4-0-7-3-12-7	B10
	7	7-4-0-12-3-5-7	B5
	5	7-4-0-12-3-6-7	B4
	3	7-4-0-12-3-7-7	B2
	4	7-4-0-12-3-8-7	B3
	3	7-4-0-12-3-9-7	B1
	4	7-4-0-12-3-12-7	B8
	5	7-4-0-12-3-13-7	B9
	6	7-4-0-12-3-14-7	B7
	4	7-4-0-12-3-24-7	B6
O146	17	6-4-0-12-10-4-7	A5
	4	6-4-0-12-10-8-7	A2
	7	6-4-0-12-10-9-7	A3
	9	6-4-0-12-10-10-7	A4
	2	6-4-0-12-10-11-7	A1

* En negrita, perfiles de la técnica de MLVA compartidos entre ECVT del serogrupo O5 y O146.

Del serogrupo O5, se analizaron 24 aislados procedentes de siete animales distintos de tres explotaciones (**Tabla 7**). Empleando la técnica de MLVA, estos aislados se clasificaron en un total de seis perfiles distintos (C1-C6) (**Tabla 22**) con una similaridad del 85.7% (**Ilustración 44**), que sólo presentaron diferencias en CVN014, mientras que la técnica de PFGE identificó 12 perfiles distintos con una similaridad del 82.9% (**Ilustración 48**).

Del serogrupo O91, se analizaron 52 aislados procedentes de 18 animales de tres explotaciones (**Tabla 8**). Empleando la técnica de MLVA, estos aislados se clasificaron en 11 perfiles distintos (B1-B11) (**Tabla 22**) con una similaridad del 71.5% (**Ilustración 45**), que presentaron diferencias principalmente en CVN004 y CVN014. Tan sólo en un caso (Perfil B10) se observó una SLV en CVN007. Empleando la técnica de PFGE se identificaron 29 distintos con una similaridad del 74.7% (**Ilustración 49**).

Finalmente, del serogrupo de ECVT O146 se analizaron 39 aislados procedentes de 11 animales de tres explotaciones (**Tabla 9**). Empleando la técnica de MLVA, estos aislados se clasificaron en cinco perfiles distintos (A1-A5) (**Tabla 22**) con una similaridad del 85.7% (**Ilustración 46**), que presentaron diferencias únicamente en CVN014. De nuevo, la técnica de PFGE identificó un mayor número de perfiles, 14 en total, con una similaridad del 85.4% (**Ilustración 50**).

En la **Tabla 23** puede apreciarse la correspondencia entre los perfiles obtenidos mediante ambas técnicas en los aislados de cada explotación. Por una parte, se observa un mayor número de perfiles en la técnica de PFGE frente a la técnica de MLVA. Por otra, aparecen perfiles indistinguibles y altamente similares en aislados obtenidos en explotaciones distintas (**Tabla 22 y 23**). Por ejemplo, el perfil C1 de PFGE se identificó en las explotaciones 2 y 11 (**Tabla 23 e Ilustración 48**). De igual forma, los perfiles C1, C3 y C4 de la técnica de MLVA se identificaron en las explotaciones 1 y 2, 2 y 11, y 1 y 2, respectivamente (**Tabla 23 e Ilustración 44**). De la misma manera, los perfiles A1 y A4 de PFGE identificados en aislados de las explotaciones 1 y 7 se diferenciaron en un solo fragmento de restricción (96.8% de similaridad) (**Tabla 23 e Ilustración 50**). Este mismo hecho, se observó de forma más acusada entre perfiles de la técnica de MLVA, con diferencias de SLV o DLV entre aislados obtenidos en distintas explotaciones (**Tablas 22 y 23**). Por ejemplo, los perfiles C1 a C6 identificados en aislados del serogrupo O5 (**Tabla 22 e Ilustración 44**) se diferenciaron por SLVs de distinto número de copias en CVN014. No obstante, la falta de información epidemiológica que vinculara las explotaciones impidió establecer conclusiones acerca de sus relaciones clonales.

Tabla 23. Correspondencia entre perfiles de las técnicas de PFGE y MLVA con el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007) identificados en los aislados de cada explotación

Serogrupo	Explotación	Perfiles de PFGE	Perfiles de MLVA
O5	1	C7, C9, C10	C1, C2, C4
	2	C1, C2, C4, C5, C6, C7, C8, C12	C1, C3, C4 , C5, C6
	11	C1, C3, C13	C2, C3
O91	1	B1, B2, B5, B6, B8, B9, B10	B1, B2, B7, B8, B9
	2	B7, B11, B12, B13, B17, B18, B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25	B1, B3, B4, B5, B6, B9
	7	B14, B15, B28, B29, B30, B31, B32, B33	B3, B10, B11
O146	1	A4, A5, A6, A7, A15, A17	A3, A4 , A5
	7	A1, A2, A3, A16, A18, A19	A2, A3, A4 , A5
	11	A10, A12	A1

* En negrita, perfiles de la técnica de MLVA compartidos entre ECVT O5 y O146.

Resultados

Ilustración 44. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 24 aislados de ECVT O5 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007).

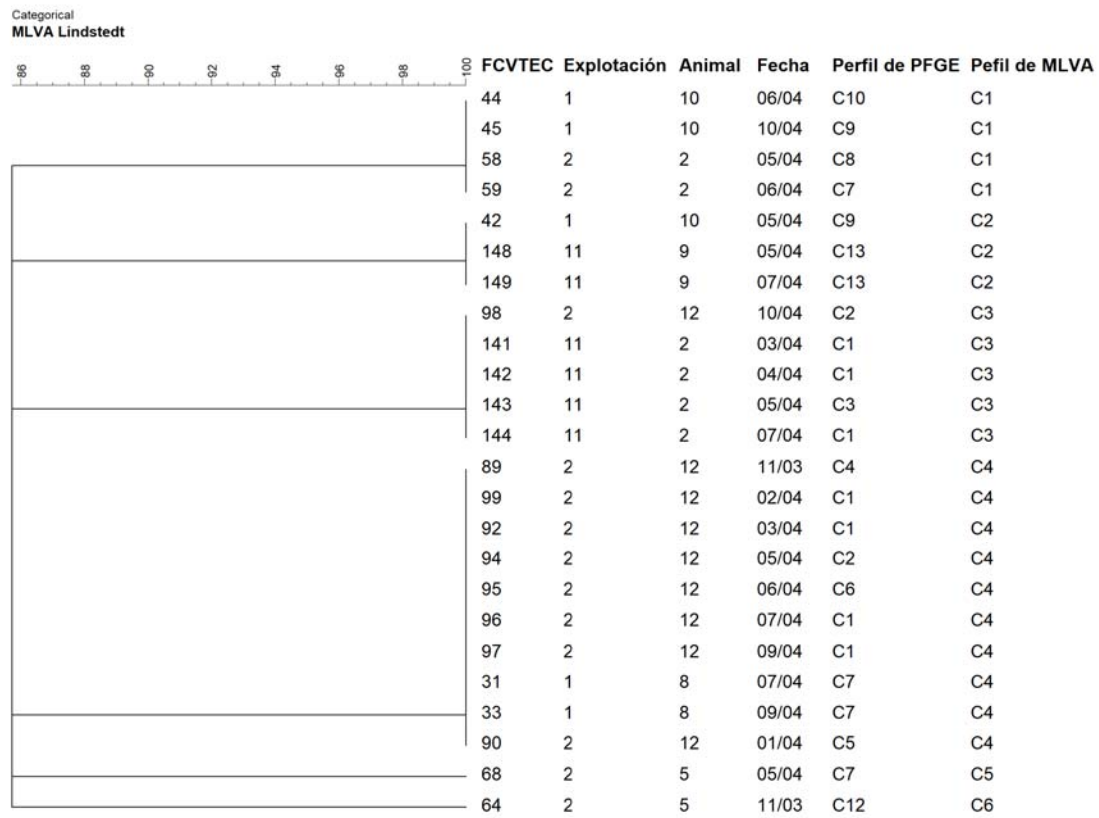
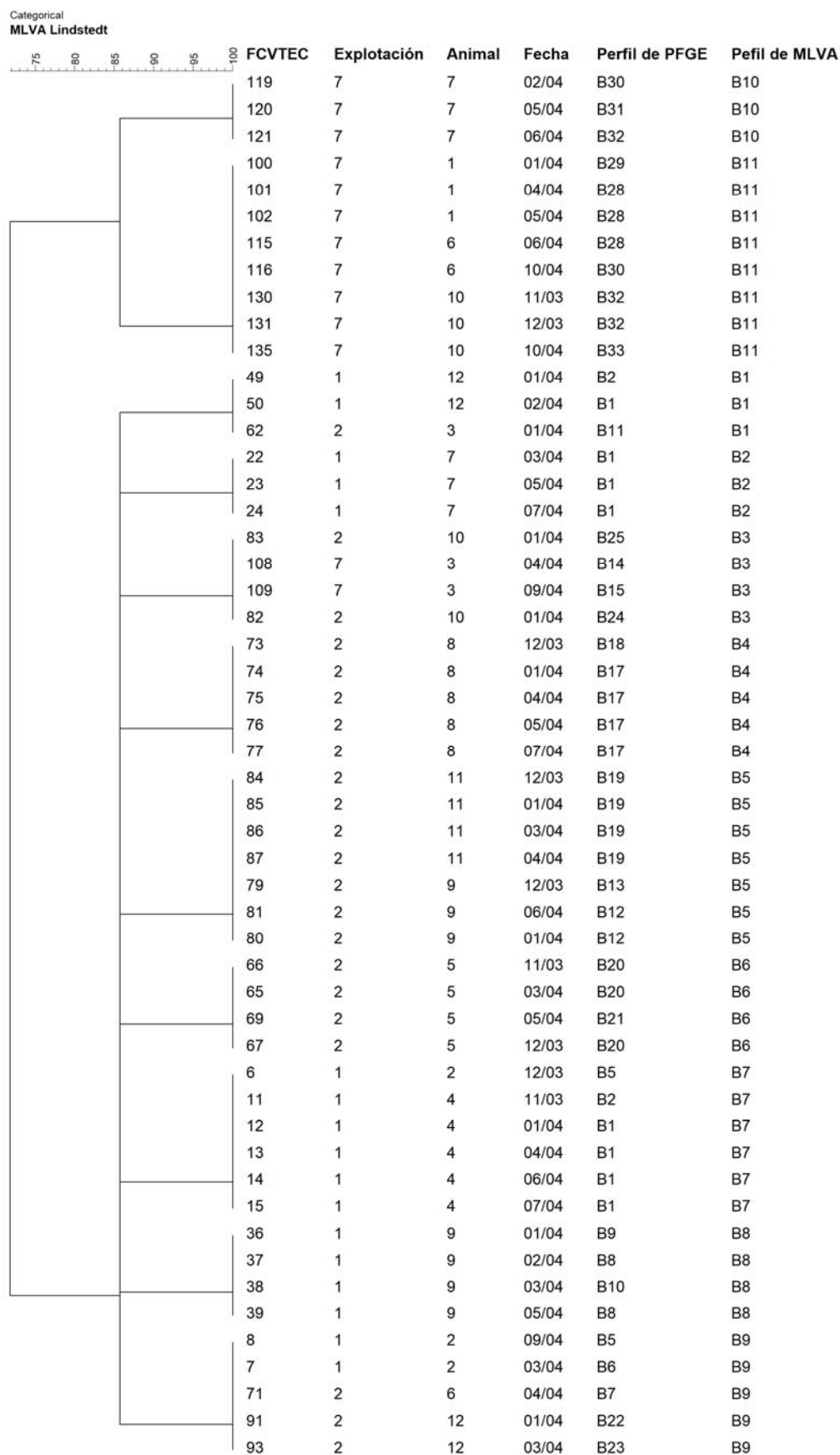


Ilustración 45. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 52 aislados de ECVT O91 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007).



Resultados

Ilustración 46. Dendrograma basado en los coeficientes categóricos correspondiente a los 39 aislados de ECVT del serogrupo O146 estudiados con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007).

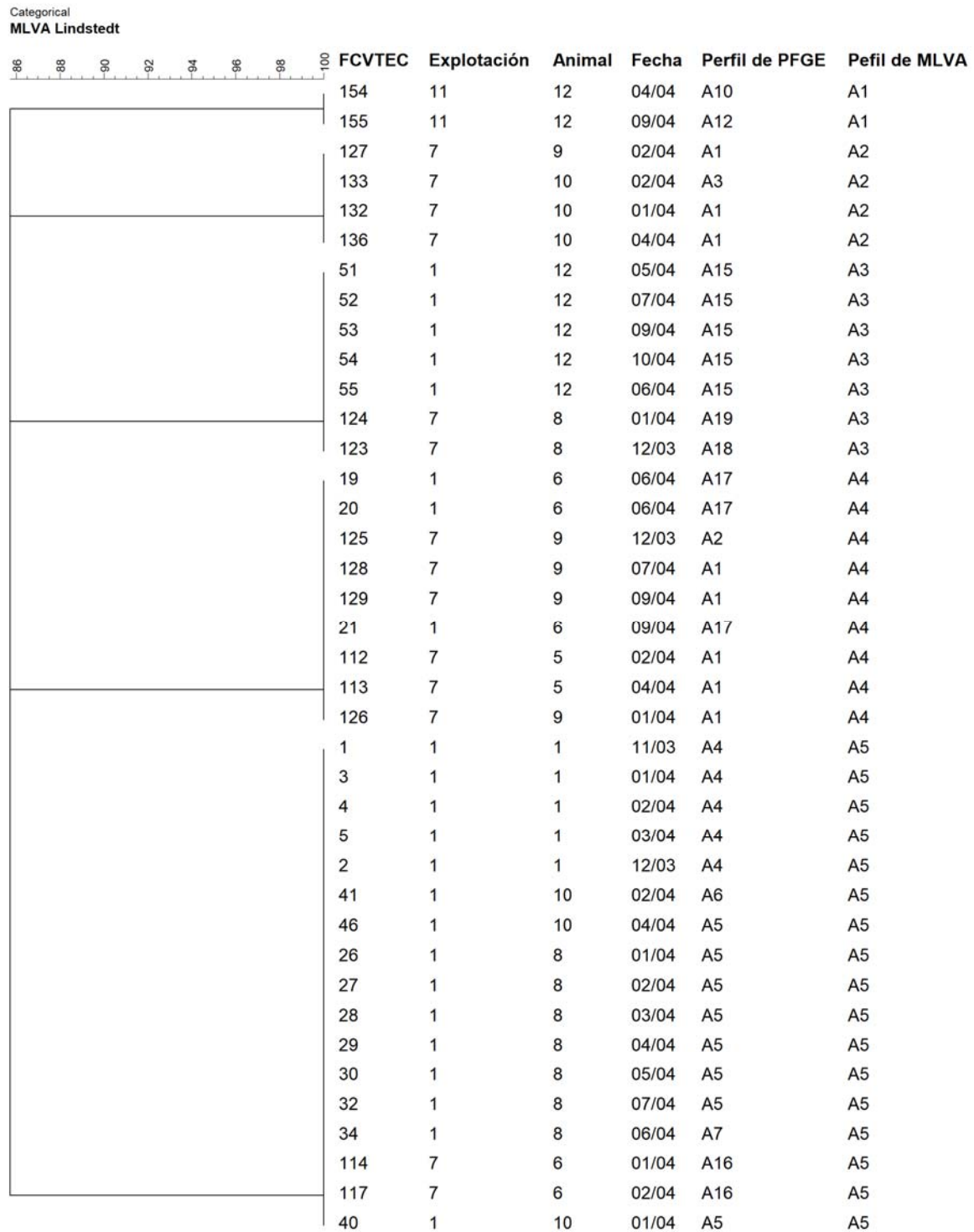
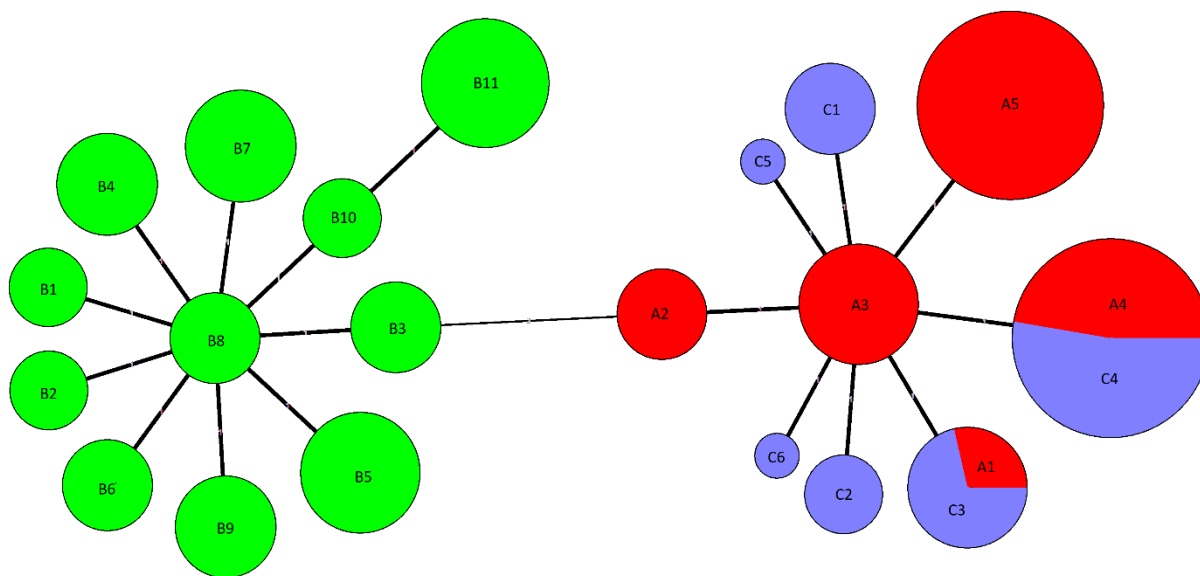


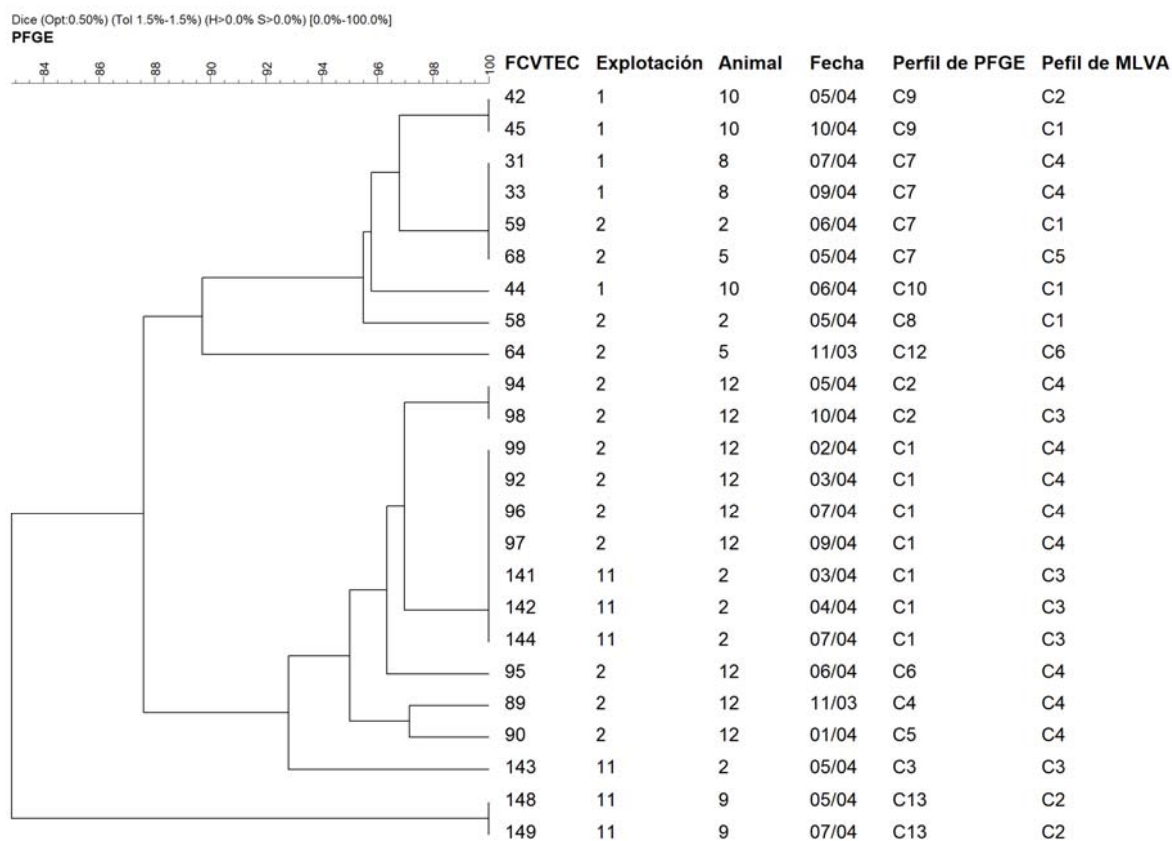
Ilustración 47. Árbol de mínima expansión correspondiente a los 115 aislados de ECVT O5, O91 y O146 estudiados mediante el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007).



El tamaño de los círculos es proporcional al número de aislados.

En verde: serogrupo O91. En rojo: serogrupo O146. En verde: serogrupo O5.

Ilustración 48. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice correspondiente a los 24 aislados de ECVT O5 estudiados mediante PFGE.



Resultados

Ilustración 49. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice correspondiente a los 52 aislados de ECVT O91 estudiados mediante PFGE.

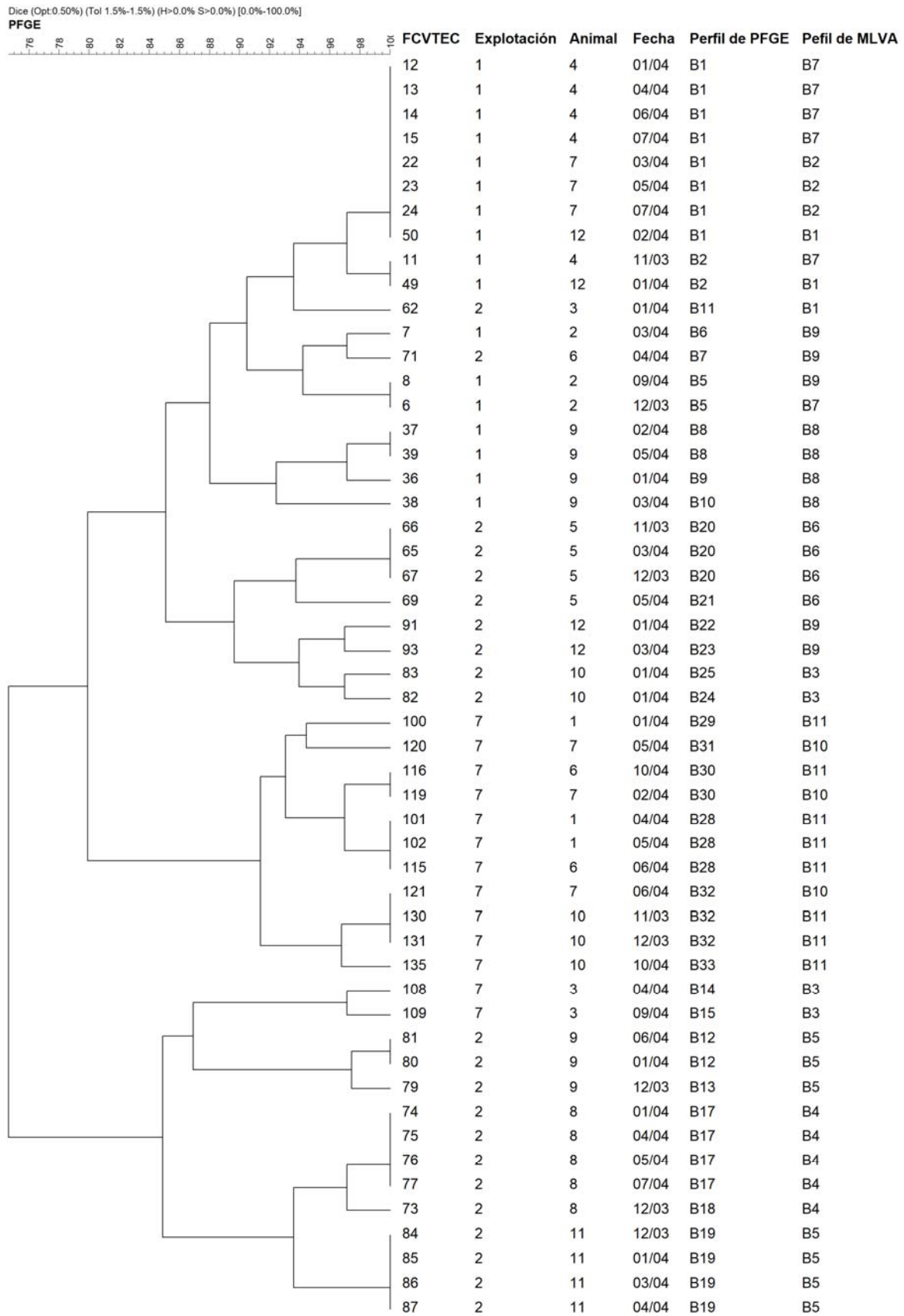
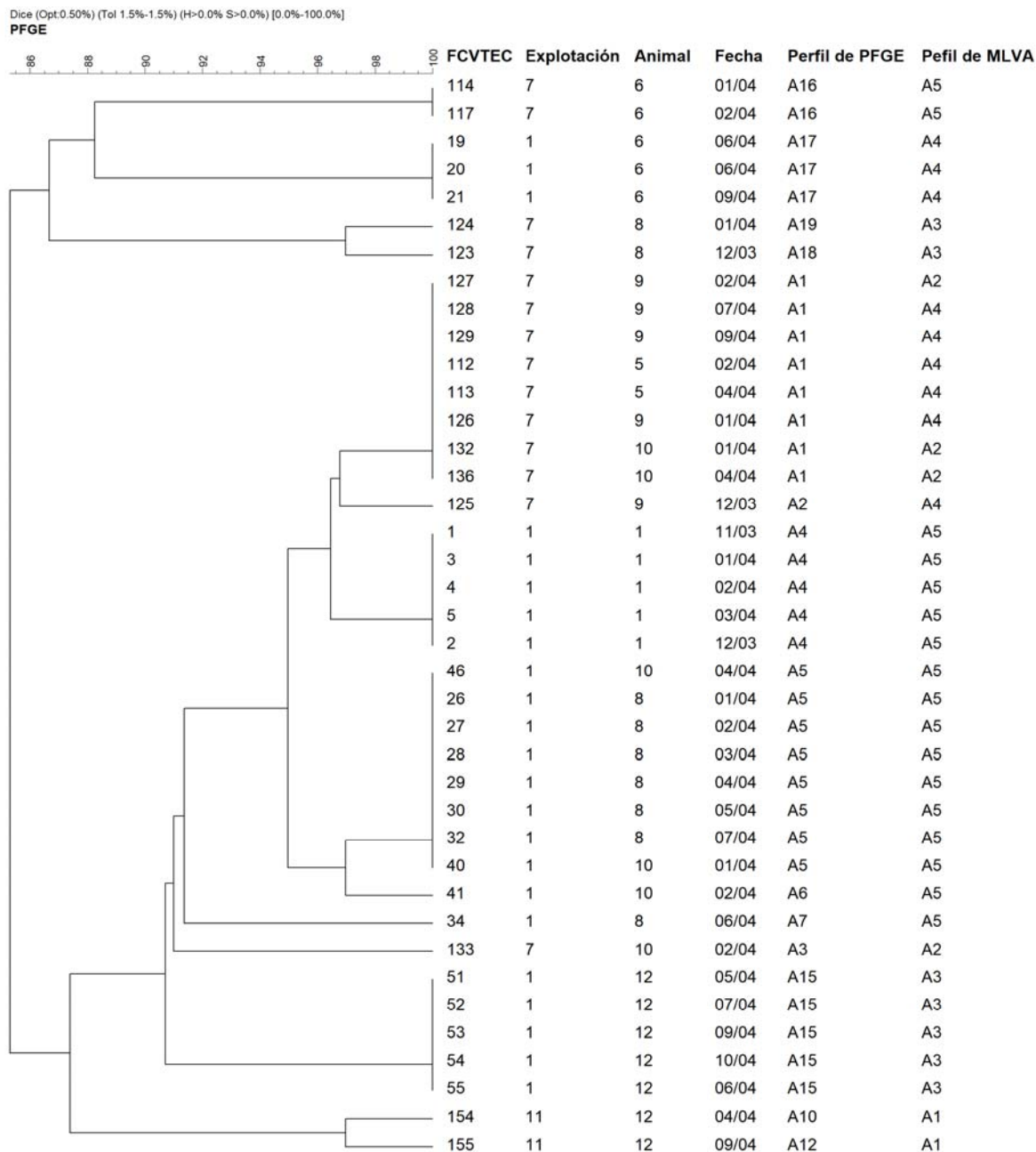


Ilustración 50. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice correspondiente a los 39 aislados de ECVT O146 estudiados mediante PFGE.



Resultados

Al analizar la distribución de clones entre aislados procedentes de animales de una misma explotación, se observó un escaso poder de discriminación de la técnica de MLVA, con el protocolo empleado, con respecto a la técnica de PFGE (**Ilustraciones 44 a 46 e Ilustraciones 48 a 50**). En todas las explotaciones en las que mediante PFGE se identificaron dos o más clones diferentes de un mismo serogrupo, la técnica de MLVA fue incapaz de distinguirlos. Por ejemplo, entre los aislados del serogrupo O5 de la explotación 2 se detectaron dos clones: los perfiles C1-C2-C4-C5-C6 en el animal 12 y C7-C8-C12 en los animales 2 y 5. Mediante la técnica de MLVA, los aislados fueron clasificados en cinco perfiles (C1, C3, C4, C5 y C6) con una SLV de diferencia (**Ilustración 52**). En serogrupo O91, entre aislados de la explotación 1 se observaron dos clones: B1-B2-B5-B6 en los animales 2, 4, 7 y 12 y B8-B9-B10 en el animal 9 (**Ilustración 54**). Mediante la técnica de MLVA, los aislados de ambos grupos de perfiles fueron clasificados en cinco perfiles (B1-B2-B7-B8-B9) con una SLV de diferencia. En el serogrupo O146, entre los aislados de la explotación 1 se detectaron dos clones: A4-A5-A6-A7-A15 en los animales 1,8, 10 y 12, y A17 en el animal 6 (**Ilustración 57**). De nuevo, mediante MLVA ambos grupos de perfiles fueron clasificados en tres perfiles (A3-A4-A5) con una SLV de diferencia.

No obstante, la técnica de MLVA, con el protocolo empleado fue capaz de agrupar los aislados obtenidos a partir de un mismo animal de forma secuencial en un mismo clon, tal y como lo hizo la técnica de PFGE (**Ilustraciones 44 a 46 e Ilustraciones 48 a 50**). Esta situación se observó en todos los aislados secuenciales de cada animal en todas las explotaciones y en todos los serogrupos (**Ilustraciones 51- 59**). Por ejemplo, en la explotación 1, los tres aislados secuenciales del serogrupo O5 del animal 10 fueron clasificados en un mismo clon por ambas técnicas (**Ilustración 51**). En este mismo sentido, en el serogrupo O91, los cinco aislados secuenciales del animal 4 de la explotación 1 (**Ilustración 54**), y en el serogrupo O146, los siete aislados secuenciales del serogrupo O146 del animal 8 en la explotación 1, fueron clasificados en un mismo clon por ambas técnicas (**Ilustración 57**).

Ilustración 51. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O5 de la explotación 1 estudiados.

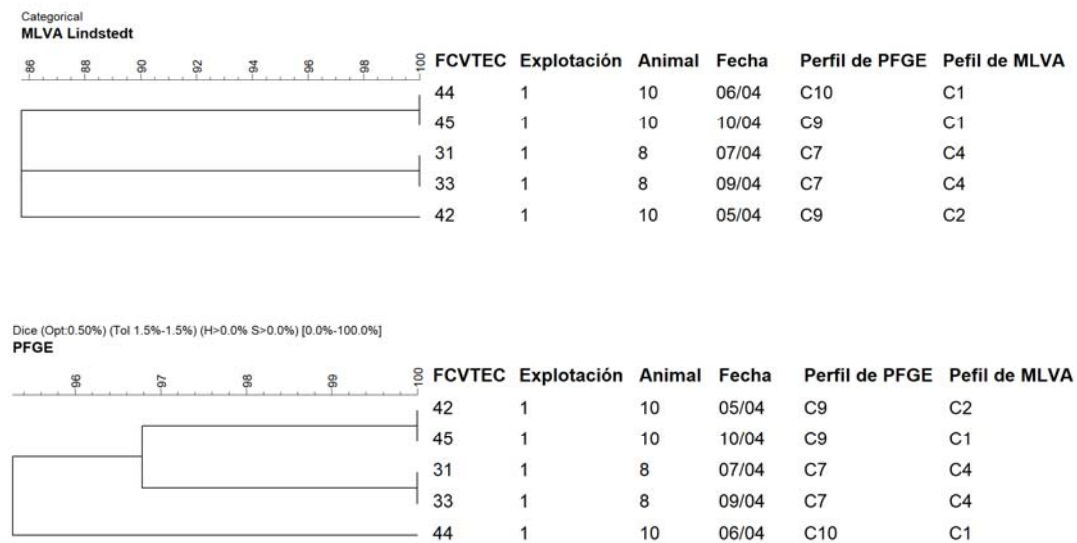
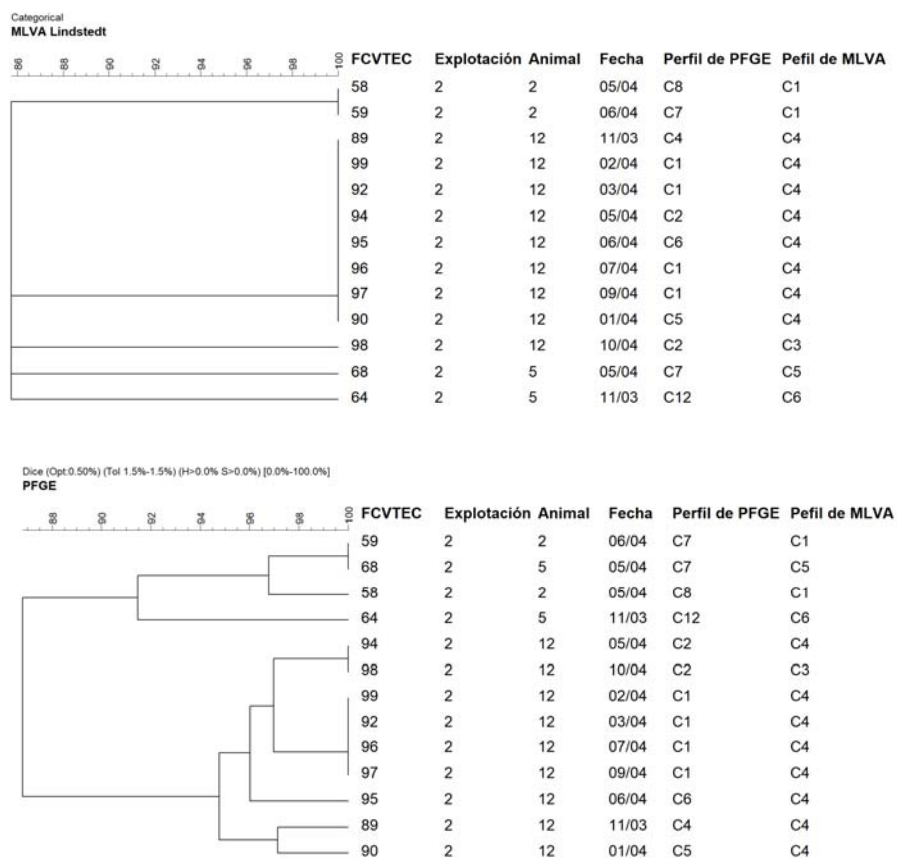


Ilustración 52. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O5 de la explotación 2 estudiados.



Resultados

Ilustración 53. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O5 de la explotación 11 estudiados.

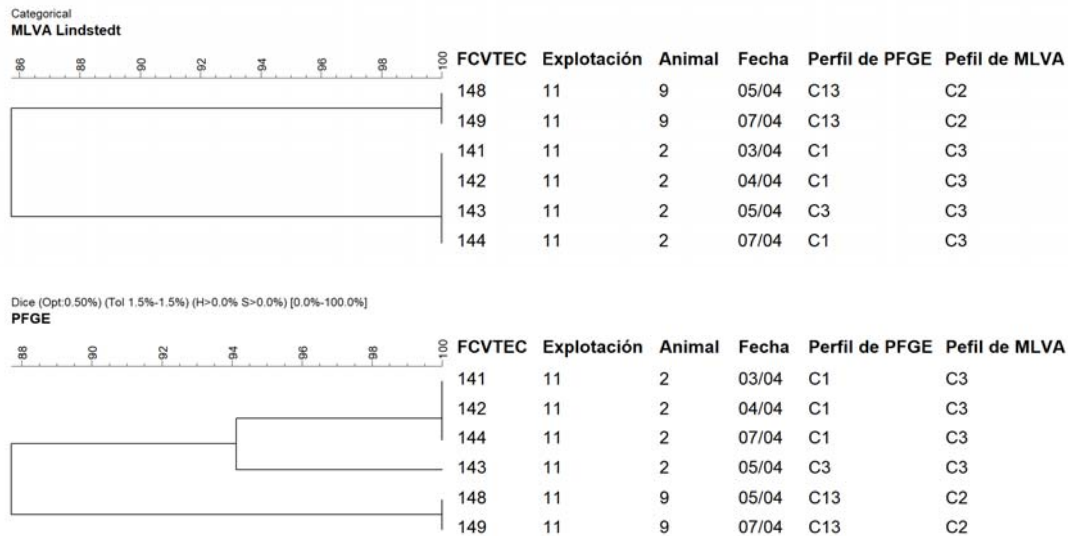


Ilustración 54. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O91 de la explotación 1 estudiados.

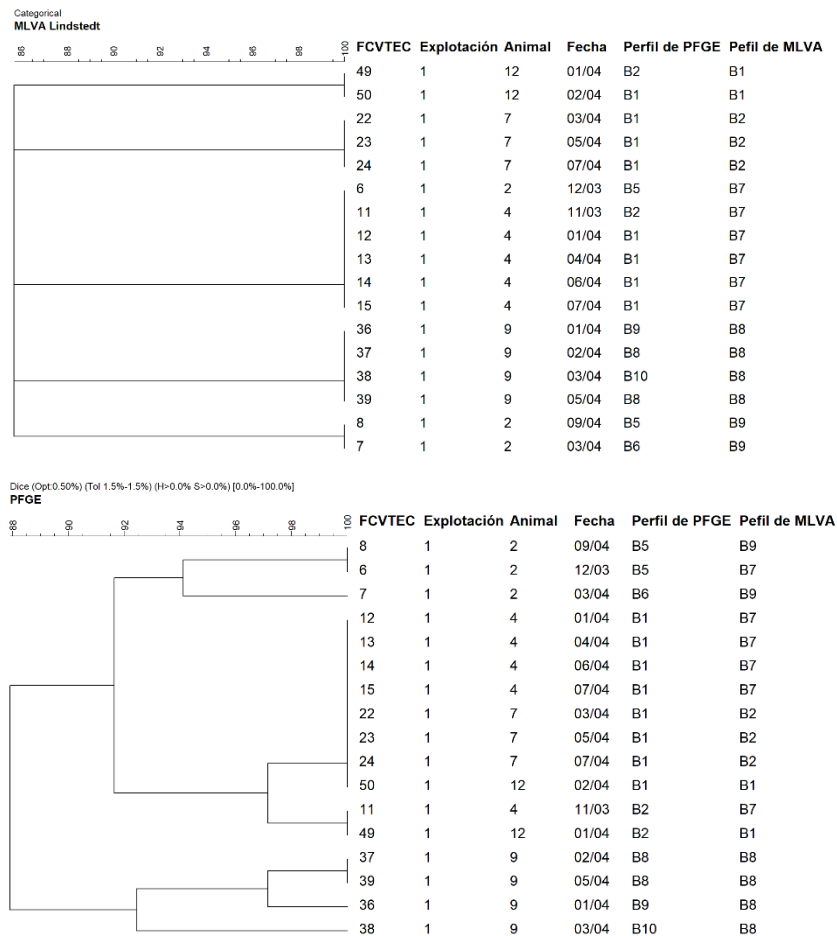
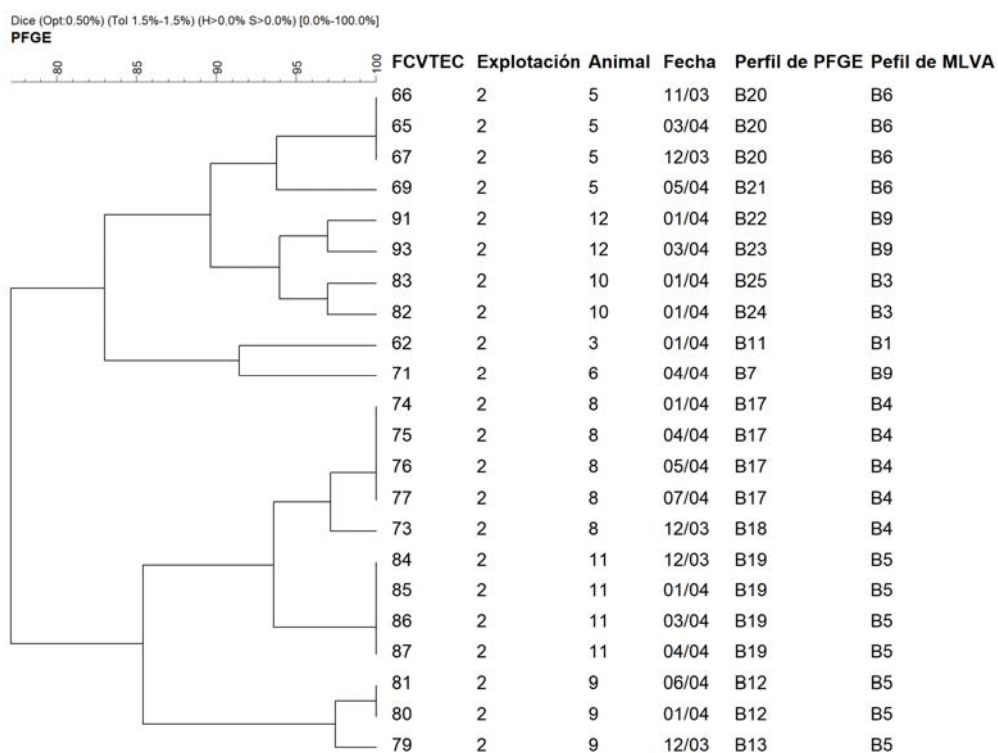
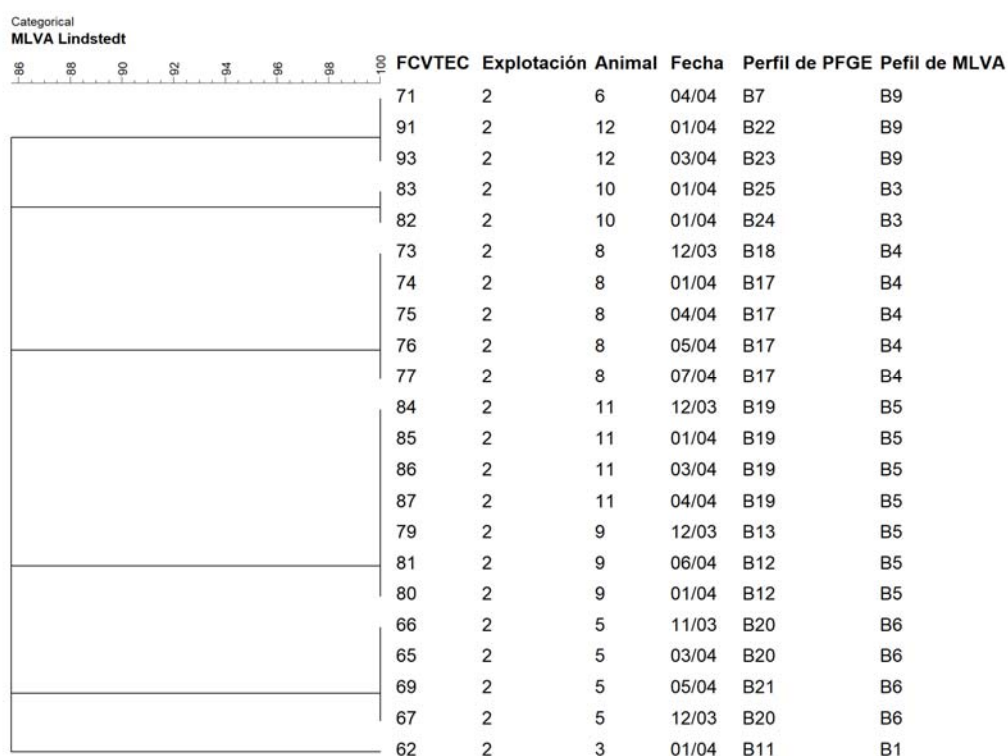


Ilustración 55. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O91 de la explotación 2 estudiados.



Resultados

Ilustración 56. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O91 de la explotación 7 estudiados.

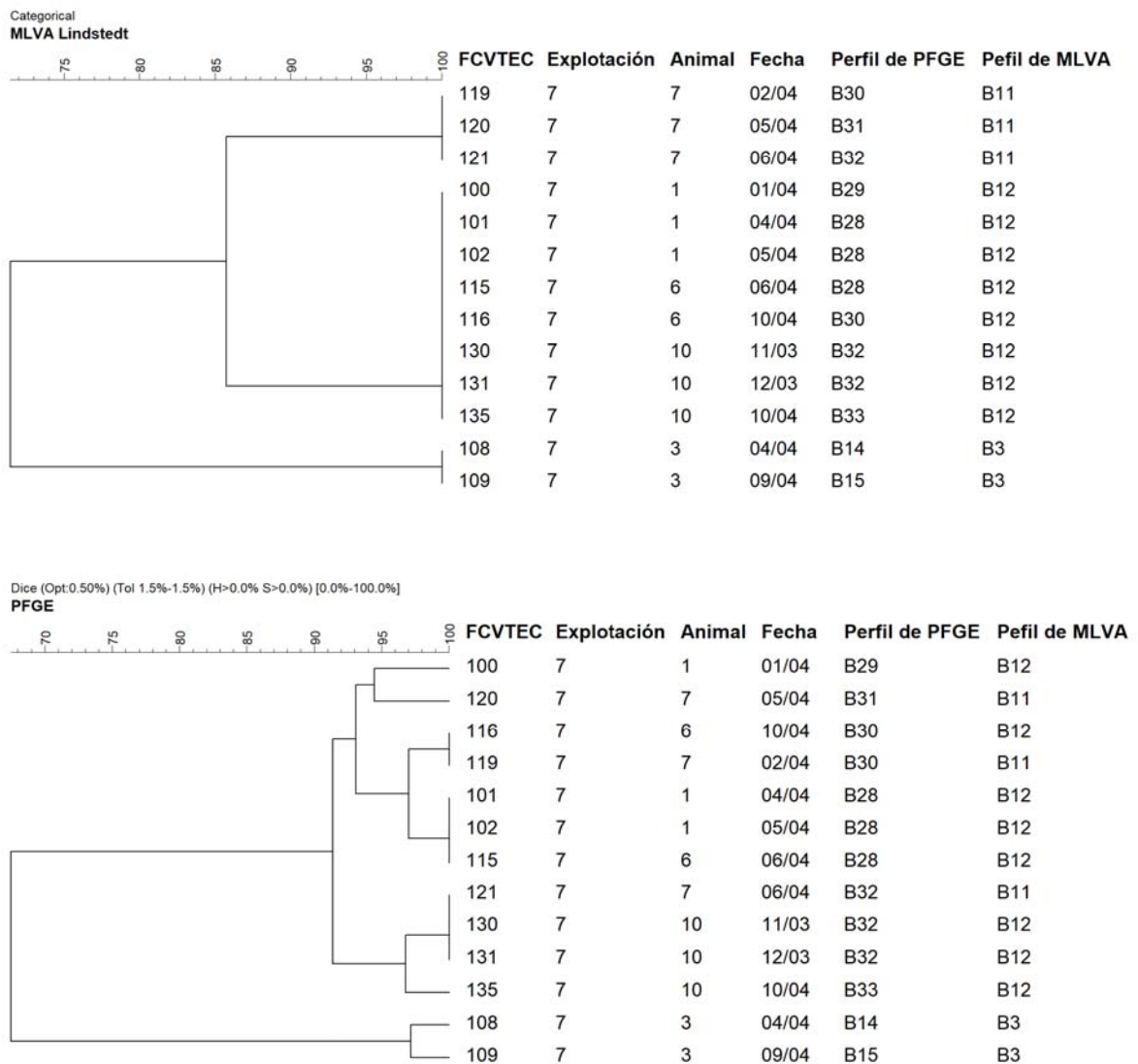
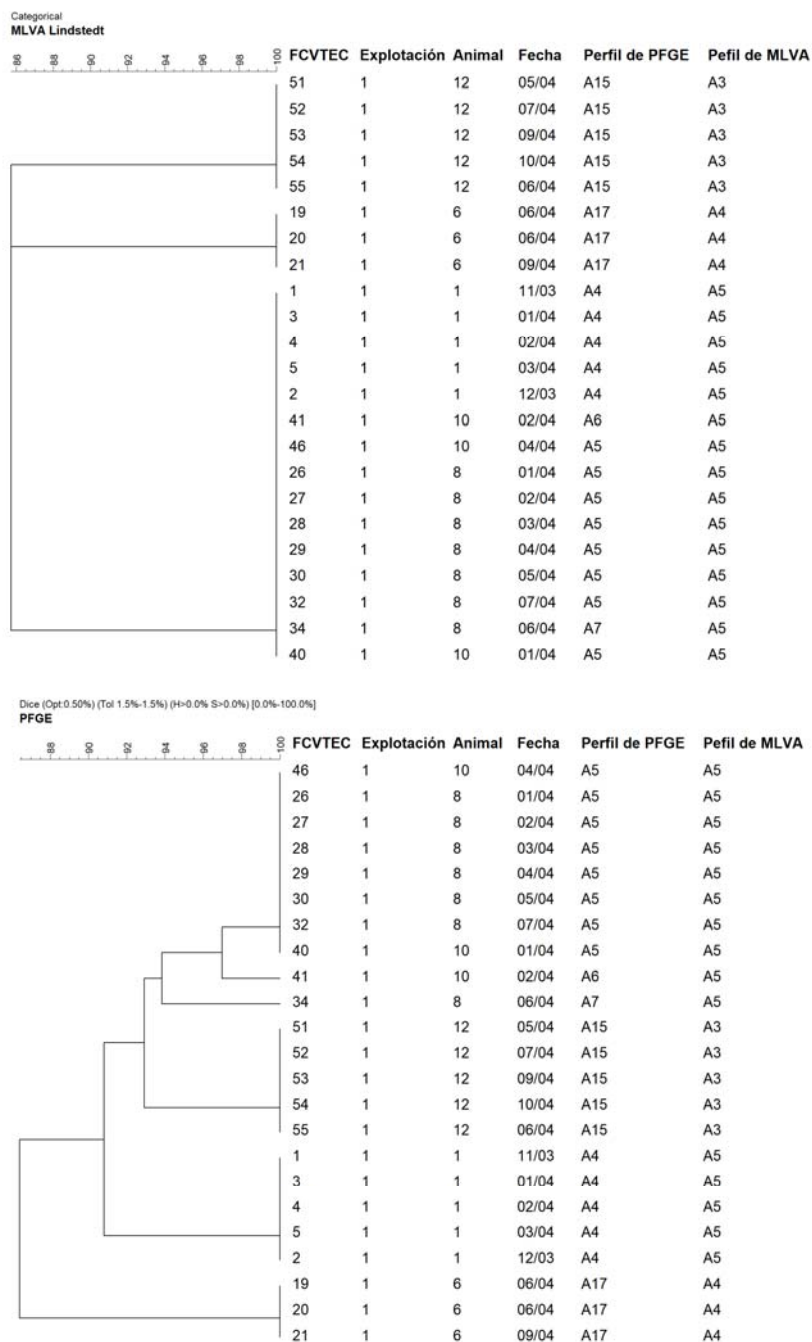


Ilustración 57. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O146 de la explotación 1 estudiados.



Resultados

Ilustración 58. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O146 de la explotación 7 estudiados.

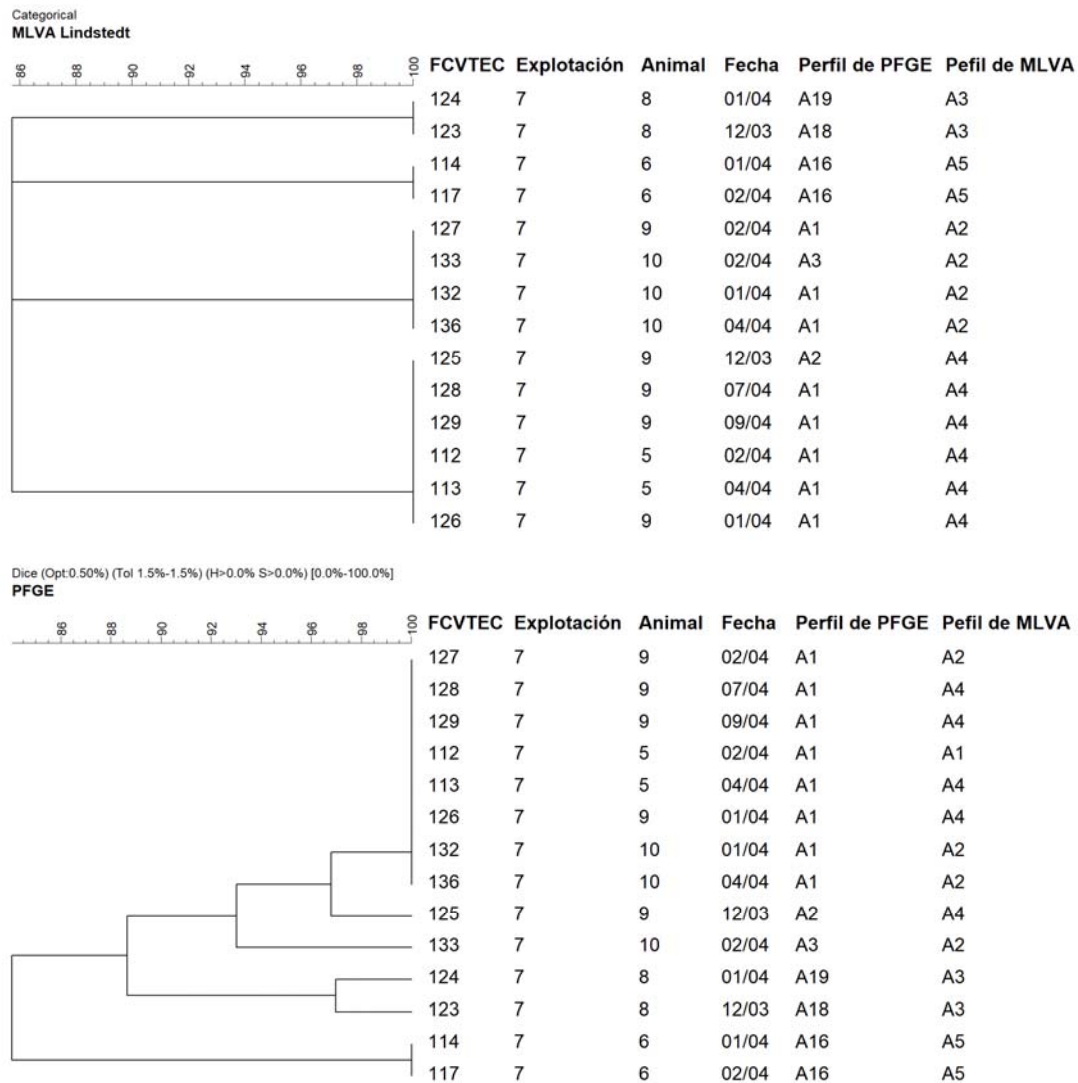
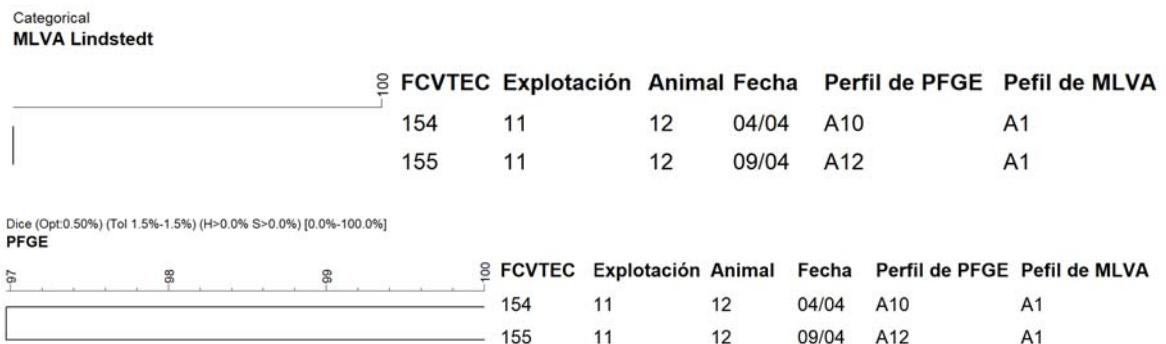


Ilustración 59. Dendrogramas basados en los coeficientes categóricos con el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) y en el coeficiente de Dice (PFGE) correspondientes a la relación de aislados de ECVT del serogrupo O146 de la explotación 11 estudiados.



DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La técnica de PFGE fue empleada por primera vez para la subtipificación del ECVT O157:H7 por Böhm and Karch (1992) y es considerada el método de referencia o “*gold standard*”, para la subtipificación tanto de esta bacteria como de muchos otros enteropatógenos bacterianos (Lindstedt, 2005). Esta técnica presenta una gran congruencia con los datos epidemiológicos en situaciones de brote, es posible aplicarla en la subtipificación de distintas bacterias con un simple cambio en la elección de las enzimas de restricción y una optimización de las condiciones de electroforesis, y produce patrones de ADN estables y reproducibles. Sin embargo, aunque esta técnica ha sido ampliamente empleada presenta algunas limitaciones, como el tiempo que requiere su desempeño (entre 2 y 4 días), el coste inicial del equipamiento necesario y su laboriosidad para ser empleada en estudios con un amplio número de aislados (Cooley *et al.*, 2007).

Otra limitación importante es la interpretación de los resultados de la técnica de PFGE. Barret *et al.* (2006) describen la presencia de perfiles de PFGE no reproducibles debido a causas relacionadas con la digestión incompleta del ADN, con la electroforesis y por trabajar, de forma accidental, con cultivos que no son puros. Según estos autores, la digestión incompleta del ADN es la que más frecuentemente provoca variaciones, con incrementos en el número de fragmentos de restricción de un perfil de PFGE. Además, la presencia de metilaciones del ADN en las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción también puede hacer variar el número de fragmentos en un perfil de PFGE (Sales *et al.*, 2007). Por otro lado, si la electroforesis no se realiza correctamente, la identificación de los fragmentos de restricción puede ser complicada por una incorrecta separación. Cuando ello sucede, dos fragmentos demasiado juntos podrían ser interpretados como uno, produciendo una variación en el perfil de PFGE.

Además, algunas cepas de ECVT O157 y no-O157 no pueden ser subtipificadas mediante esta técnica (Lindstedt *et al.*, 2007) debido a que presentan excesivas endonucleasas endógenas que degradan el ADN (Johnson *et al.*, 1995; Izumiya *et al.*, 1997; Pradel *et al.*, 2001; Mora *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2004; Heinikainen *et al.*, 2007). En algunos casos, la adición de tiourea en el tampón durante la electroforesis previene la degradación del ADN por estas endonucleasas. En otras ocasiones, la técnica de PFGE no ofrece la capacidad de diferenciación necesaria. Un ejemplo de ello es la base de datos nacional del CDC PulseNet, que en 2006 contenía 4 585 perfiles de PFGE únicos empleando la enzima *Xba*I de más de 15 000 aislados (Gerner-Smidt *et al.*, 2006). Aproximadamente el 53% de estos perfiles únicos de PFGE estaban representados por un solo aislados (Hyytiä-Trees *et al.*, 2006). Además, según Hyytiä-Trees *et al.* (2006) existen

Discusión

muchos clústeres en los que no es posible establecer relaciones epidemiológicas, por lo que es necesario el empleo de otras enzimas de restricción u otros métodos de subtipificación que están siendo desarrollados, como pueden ser la técnica de MLVA o la WGS.

Igualmente, la técnica de MLVA, ha sido empleada con éxito para la subtipificación de aislados de ECVT (van Belkum *et al.*, 1998; Lindstedt *et al.*, 2013). Esta técnica ofrece potenciales ventajas sobre la técnica de PFGE, incluyendo la reducción de tiempo en ensayos y el bajo coste de algunos protocolos (Caméléna *et al.*, 2019), y comparte con ella la posibilidad de transferir datos entre laboratorios.

Desde la publicación de los primeros protocolos de la técnica de MLVA para la subtipificación de cepas de ECVT O157:H7 en el año 2003 (Lindstedt *et al.*, 2003; Noller *et al.*, 2003), se han optimizado protocolos tanto para ECVT O157 como no-O157 (Keys *et al.*, 2005; Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Lindstedt *et al.*, 2007; Kawamori *et al.*, 2008). Los protocolos de la técnica de MLVA descritos por Keys *et al.* (2005) y Hyytiä *et al.* (2006) emplean 32 y 9 VNTR respectivamente, incluyendo las seleccionadas por Noller *et al.* (2003).

En la primera parte de este estudio, se evaluó la aplicabilidad del protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) para la subtipificación de 63 aislados de *E. coli* O157:H7 de origen animal y humano, con y sin relación epidemiológica conocida. Con los criterios aplicados en el presente trabajo, en todas las explotaciones, ganaderías, fincas, brotes y casos esporádicos de infección en las que mediante PFGE se identificaron uno o más clones entre los aislados con información epidemiológica disponible, el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller *et al.* (2003) estableció las mismas relaciones clonales entre los aislados. En cuanto al análisis de aislados sin información epidemiológica disponible, ambas técnicas clasificaron algunos aislados estableciendo relaciones clonales no explicables con la información existente. No obstante, a diferencia de la técnica de PFGE, los resultados de este protocolo de la técnica de MLVA fueron más precisos a la hora de diferenciar aislados con y sin información epidemiológica, tal y como se deduce del análisis combinado de ambas técnicas, razón por la cual puede ser empleado como complemento de la técnica de PFGE.

Distintos trabajos han comparado la aplicabilidad de la técnica de MLVA en *E. coli* O157 con otras como PFGE y WGS (Lindstedt *et al.*, 2004, 2007; Noller *et al.*, 2003; Lindstedt *et al.*, 2003; Keys *et al.*, 2005; Cooley *et al.*, 2007; Kawamori *et al.*, 2008; Izumiya *et al.*, 2010; Dyet *et al.*, 2011; Eriksson *et al.*, 2011; Dallman *et al.*, 2015; Butcher *et al.*, 2016; Rowell *et al.*, 2016; Rumore *et al.*,

2016; Nakamura *et al.*, 2018; Caméléna *et al.*, 2019). Si bien no sería esperable una concordancia exacta entre las técnicas de PFGE, WGS y MLVA, dado que los fundamentos de las mismas son distintos (Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Rowell *et al.*, 2016), en muchos de estos trabajos comparativos se ha observado una buena congruencia entre ambas técnicas y la técnica de MLVA con protocolos que incluyeron las VNTR descritas por Noller *et al.* (2003), tal y como se ha puesto de manifiesto asimismo en esta primera parte del presente estudio.

En este sentido, Noller *et al.* (2003) establecieron las mismas relaciones clonales en 21 aislados de *E. coli* O157:H7 de cinco brotes distintos mediante las técnicas de PFGE y MLVA. Además, la técnica de MLVA clasificó igual que la técnica de PFGE 35 casos esporádicos de *E. coli* O157:H7, y fue capaz de diferenciar 24 aislados de *E. coli* O157:H7 con perfiles de PFGE de menos de un fragmento de restricción de diferencia sin información epidemiológica disponible, tal y como se ha observado en nuestro estudio. Por tanto, esta es una de las ventajas relevantes que ofrece el uso de la técnica de MLVA para el subtipado de aislados de *E. coli* O157:H7. Asimismo, Keys *et al.* (2005), emplearon un protocolo de la técnica de MLVA con 37 VNTR que incluyó las descritas por Noller *et al.* (2003) y establecieron relaciones clonales similares a las obtenidas con la técnica de PFGE. Igualmente, observaron que la técnica de PFGE no fue capaz de diferenciar entre algunos aislados que, sin pertenecer a un mismo brote, presentaron cercanía temporal o geográfica, mientras que la técnica de MLVA sí lo hacía. No obstante, también apreciaron casos en los que la técnica de MLVA no fue capaz de diferenciar entre aislados claramente distintos mediante la técnica de PFGE.

De la misma manera, en 2006, Hyytiä-Trees *et al.* analizaron 44 aislados de *E. coli* O157:H7 de ocho brotes distintos, y observaron las mismas relaciones clonales que mediante la técnica de PFGE. El protocolo de la técnica de MLVA empleado incluyó las VNTR descritas por Noller *et al.* (2003) y dos VNTR más (VNTR-36 y VNTR37). En este caso encontraron mayor congruencia entre ambas técnicas cuando se incluyeron los resultados de PFGE empleando una segunda enzima de restricción. Con este protocolo, la técnica de MLVA fue capaz de diferenciar los aislados de casos esporádicos indistinguibles mediante PFGE. En 2010, en Japón, Sakai *et al.* (2010b) estudiaron diez aislados de *E. coli* O157:H7 relacionados con un brote empleando un protocolo de la técnica de MLVA con nueve VNTR que incluyó las descritas por Noller *et al.* (2003). Dichos aislados presentaron perfiles de PFGE con un fragmento o menos de diferencia entre ellos, salvo un aislado con más de tres fragmentos de diferencia. El protocolo de la técnica de MLVA empleado permitió establecer las mismas relaciones clonales que la técnica de PFGE, ya que todos los aislados menos uno, con diferencias de repetición en ocho VNTR, fueron clasificados como un mismo clon.

Discusión

Igualmente, en 2011, Konno *et al.* analizaron 18 aislados de *E. coli* O157:H7 de distintos casos de la Prefectura de Akita en Japón empleando las técnicas de PFGE y MLVA. Para la realización de la técnica de MLVA emplearon un protocolo con nueve VNTR que incluyó las descritas por Noller *et al.* (2003). Las relaciones clonales establecidas por ambas técnicas fueron similares, si bien la técnica de MLVA con el protocolo descrito fue capaz de diferenciar tres casos esporádicos identificados como un clon mediante PFGE. Dyet *et al.* (2011) identificaron relaciones clonales empleando la técnica de MLVA y la técnica de PFGE. En este caso, los autores estudiaron 80 aislados de casos con enfermedad gastrointestinal en Nueva Zelanda. Entre estos aislados, analizaron 24 con información epidemiológica disponible vinculado a ocho brotes familiares. El protocolo de la técnica de MLVA empleado incluyó todas las VNTR descritas por Noller *et al.* (2003) salvo TR2. Con la técnica de MLVA identificaron ocho clones que incluyeron a los aislados con información epidemiológica disponible, mientras que con la técnica de PFGE, uno de los clones compuesto por dos aislados no fue detectado. Además, la técnica de MLVA consiguió diferenciar dos aislados sin información epidemiológica disponible, pero con perfiles indistinguibles de PFGE, del resto de aislados pertenecientes a dos brotes domésticos. Watahiki *et al.* en 2014 analizaron 39 aislados de *E. coli* O157:H7 pertenecientes a un mismo brote mediante la técnica de PFGE y un protocolo de la técnica de MLVA que incluye las VNTR descritas por Noller *et al.* (2003) y dos VNTR más (VNTR-36 y VNTR37). De nuevo, ambas técnicas establecieron las mismas relaciones clonales.

Al aplicar el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller *et al.* (2003) sobre la colección de aislados estudiados se obtuvieron valores de ID más elevados en TR2, TR1 y TR5, hecho que ha sido descrito previamente por otros autores (Lindstedt *et al.*, 2003; Noller *et al.*, 2003; Keys *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2008; Urdahl *et al.*, 2008; Dyet *et al.*, 2011). Por el contrario, el menor valor de ID se encontró en TR6 y TR4, hecho que también ha sido observado por distintos autores (Lindstedt *et al.*, 2003; Dyet *et al.*, 2011). El valor del ID refleja la diversidad de alelos que aporta cada una de las VNTR del protocolo estudiado y, por tanto, el poder de discriminación entre aislados que posee dicho protocolo. En el presente trabajo, la diversidad observada en TR2, TR1 y TR5 ha permitido diferenciar aislados con y sin relación epidemiológica evidente que sin embargo presentaban perfiles de PFGE indistinguibles (**Ilustración 23**), por lo que estas han demostrado ser relevantes para la subtipificación genotípica de los aislados estudiados. En este mismo sentido, Keys *et al.* (2005) observaron que al comparar el poder de discriminación de las técnicas de MLVA y PFGE, las VNTR con valores de ID bajos o medios contribuyeron a diferenciar aislados de forma similar a la técnica de PFGE, mientras que las VNTR como el TR2 con ID elevados, fueron los que desempeñaron un papel más relevante para discriminar aislados genéticamente similares. Por tanto, un protocolo ideal de la técnica de MLVA debería contener el número mínimo necesario de

VNTR con distintas tasas de mutación de forma que permita proporcionar una alta discriminación entre aislados no relacionados ni genética ni epidemiológicamente, a la vez que permita subtipificar de manera correcta aislados genéticamente similares y con relación epidemiológica. Las VNTR con tasas de mutación altas pueden discriminar entre relacionados genéticamente próximos, pero pueden tener un valor limitado entre cepas no relacionadas debido a la homoplasia. Combinar estas VNTR con otras que dispongan de tasas de mutación bajas mitiga los efectos de la homoplasia, aunque estas proporcionen una menor discriminación entre aislados.

Entre los aislados estudiados, tan sólo reparamos en la ausencia de repeticiones en la VNTR TR1 del aislado FVCC13. En el mismo sentido, otros autores han observado la ausencia de repeticiones o de producto en esta misma VNTR (Keys *et al.*, 2005; Hyttiä-Trees *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2008; Urdahl *et al.*, 2008; Jenke *et al.*, 2010; Prendergast *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2011), incluso con frecuencias de aparición de un 80% y un 31% de alelos nulos en TR1 entre los aislados en los trabajos de Jenke *et al.* (2010) y Yun *et al.* (2011), respectivamente. Según Hyttiä-Trees *et al.* (2006), estos resultados podrían responder a distintas situaciones, como fallos en la amplificación por PCR debido a mutaciones en las secuencias donde se unen los cebadores, o incluso, deleciones completas de la región VNTR y las secuencias flanqueantes.

El análisis de los resultados de la técnica de MLVA permitió observar SLV con entre una y cinco repeticiones de diferencia entre aislados relacionados epidemiológicamente procedentes de una misma explotación de ganado ovino, una misma finca o en aislados secuenciales obtenidos a partir de un paciente y un jabalí abatido en la misma área de salud. En cuanto a la interpretación de la técnica de MLVA, no existen unos criterios comunes entre laboratorios, no obstante, Noller *et al.* (2003) propusieron que aislados con variaciones de una o dos repeticiones en una sola VNTR pueden tener un origen común y por tanto pertenecer a un mismo clon. Posteriores estudios sobre la presencia de mutaciones en las VNTR descritas en el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) han demostrado que pueden observarse variaciones de múltiples repeticiones en una VNTR en aislados con un origen común (Noller *et al.*, 2006; Vogler *et al.*, 2006). Noller *et al.* (2006) observan mutaciones sobre todo en TR2, aunque también en TR5 y TR1. Casi todas las variaciones fueron incrementos de una copia de repetición, si bien observaron también deleciones de una copia e incrementos de dos y tres copias en TR2. Por otro lado, Vogler *et al.* (2006) observan en su estudio que un 25.3% de las mutaciones (47/186) se debieron a cambios de entre dos y 20 repeticiones en una misma VNTR. Además, 12 de las 47 repeticiones incluyeron variaciones, casi todas deleciones, de más de cuatro repeticiones en una misma VNTR. Estos mismos resultados fueron confirmados en 2013 por Bustamante *et al.* que obtuvieron hasta un 48% de variaciones de múltiples

Discusión

repeticiones en una VNTR (27/57). Además, un 57% (14/27) de estas variaciones se debieron a cambios de más de cuatro repeticiones en una misma VNTR.

Varios autores han observado que la aceptación de SLV de una o dos repeticiones entre aislados pertenecientes a una misma cepa, criterio expuesto por Noller *et al.* (2003), no resultaba apropiado para la interpretación de los resultados obtenidos. En 2008, Murphy *et al.* realizaron un estudio empleando el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller *et al.* (2003) para identificar posibles rutas de diseminación de *E. coli* O157 dentro de una explotación bovina. Debido a la variabilidad observada, sobre todo en TR2, pocos de los aislados cumplían el criterio de SLV propuesto por Noller *et al.* (2003). Sin embargo, los resultados obtenidos en el MST (Figura 1) expuesto por Murphy *et al.* (2008) sí serían congruentes aplicando el criterio empleado en el presente trabajo. Ese mismo año, Pei *et al.* 2008, realizaron un análisis empleando las técnicas de MLVA y PFGE de 100 aislados de casos esporádicos de infección y brotes causados por ECEH O157:H7. En su trabajo, dos aislados (con referencias 051376 y 051377) de un brote intrafamiliar (F103) con perfiles de PFGE indistinguibles empleando dos enzimas de restricción, no cumplían el criterio de Noller *et al.* ya que presentaban un SLV con cuatro repeticiones de diferencia, por lo que podrían haber sido contemplados como aislados no relacionados analizando los datos obtenidos mediante la técnica de MLVA. Sin embargo, al aplicar los criterios empleados en el presente trabajo para la técnica de MLVA, dicho brote intrafamiliar sería correctamente clasificado. En los mismos términos, Sakai *et al.* (2010) encontraron variaciones de más de una copia en TR1 y TR2 de aislados con perfil indistinguible de PFGE con *Xba*I asociados a un mismo brote. De nuevo, aplicando los criterios empleados en el presente trabajo para la técnica de MLVA, dichos aislados serían correctamente clasificados.

Con estos precedentes, otros autores emplearon el mismo criterio que hemos asumido para la interpretación de la técnica de MLVA en este estudio. Un ejemplo de ello es el trabajo publicado por Butcher *et al.* (2016), en el que utilizan la técnica de MLVA con un protocolo que incluye las VNTR descritas por Noller *et al.* (2003), sin incluir TR2 y añadiendo dos VNTR más (VNTR-36 y VNTR37), para la identificación de casos de infección en un brote de ECVT O157 asociado al consumo de leche cruda de vaca. Los aislados obtenidos (tres a partir de heces de vaca y 14 aislados clínicos) presentaron perfiles indistinguibles o con SLV y DLV de varias repeticiones de diferencia con respecto al perfil de MLVA causante del brote. Otro ejemplo es el estudio realizado por (Rowell *et al.*, 2016), en el que describen y estudian un brote de ECVT O157 asociado al contacto con corderos empleando el mismo protocolo que en el trabajo anterior. Los 14 aislados obtenidos de pacientes afectados por el brote presentaron perfiles de MLVA indistinguibles o con SLV, mientras

que, de siete aislados de origen ovino, seis presentaron perfiles de MLVA indistinguibles con el perfil causante del brote y uno presentó DLV con varias repeticiones de diferencia. Estos resultados, los obtenidos en el presente trabajo y la información disponible hasta la fecha sobre las tasas de mutación de las VNTR, indican que es necesario ampliar el criterio propuesto por Noller *et al.* (2003) para considerar que dos aislados pueden tener un origen común y por tanto pertenecer a un mismo clon.

En la segunda parte de este estudio se evaluó la aplicabilidad del protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) para la subtipificación genotípica de 63 aislados de *E. coli* O157:H7 de origen animal y humano, con y sin relación epidemiológica conocida. Con los criterios aplicados en el presente trabajo, en todas las explotaciones, ganaderías, fincas, brotes y casos esporádicos de infección en las que mediante PFGE se identificaron uno o más clones entre los aislados con información epidemiológica disponible, el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* (2007) estableció las mismas relaciones clonales entre los aislados. En cuanto al análisis de aislados sin información epidemiológica disponible, ambas técnicas clasificaron algunos aislados estableciendo relaciones clonales no explicables con la información existente, pero al contrario de lo que sucedía al aplicar el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller *et al.* (2003), se observó un número inferior de perfiles MLVA al comparar con PFGE, por lo que se obtuvo menor precisión a la hora de establecer relaciones clonales entre aislados sin información epidemiológica existente. No obstante, a diferencia del PFGE, los resultados de la técnica de MLVA con el protocolo descrito por Lindstedt *et al.* (2007) fueron más precisos a la hora de diferenciar aislados con y sin información epidemiológica, razón por la cual este protocolo puede ser igualmente empleado como complemento de la técnica de PFGE.

En la bibliografía consultada, pocos estudios han aplicado el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) para la subtipificación genotípica de aislados de ECVT O157:H7 de distintos orígenes como en el presente trabajo. Cuando se ha llevado a cabo, ha sido sobre colecciones de ECVT de distintos serogrupos en las que había pocos aislados del serotipo O157:H7 (menos de 15 aislados) y no se compararon los resultados con la técnica de PFGE (Bustamante *et al.*, 2009b, 2012; Løbersli *et al.*, 2012; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2015) salvo en uno de ellos (Nakamura *et al.*, 2018). No obstante, los estudios analizados obtienen resultados similares a los ya expuestos en esta segunda parte de nuestro estudio.

Discusión

En este sentido, Bustamante *et al.* (2009b) estudiaron la aplicabilidad de este protocolo de la técnica de MLVA en 14 aislados ECVT O157:H7, de origen humano y bovino, y en aislados de otros serogrupos ECVT. Los autores destacaron la existencia de clonalidad entre los aislados pertenecientes a varios serotipos incluyendo el ECVT O157:H7. Al analizar los resultados empleando el criterio expuesto en esta tesis doctoral, entre estos 14 aislados con y sin relación epidemiológica conocida (espacial y temporal) se observan seis clones. Los aislados con relación epidemiológica son correctamente clasificados, mientras que se establecen relaciones clonales no explicables entre aislados sin aparente relación epidemiológica (obtenidos en años distintos).

En 2011, Jenke *et al.* estudiaron 42 aislados de la colección HUSEC, que incluye todos los serotipos de ECEH causantes de SUH aislados en Alemania entre 1996 y 2006, empleando el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007). Entre otros ECEH, incluyeron un aislado del serotipo O157:H7 y dos del serotipo O157:H-. Aplicando el criterio empleado en el presente trabajo, este protocolo de la técnica de MLVA establecería igualmente relaciones clonales no explicables entre los dos aislados del serotipo O157:H- (dos perfiles con un SLV de varias repeticiones) sin relación epidemiológica conocida, ya que fueron aislados en años distintos. Ya en 2015, Reyes-Rodríguez *et al.* analizaron, aplicando este mismo protocolo de la técnica de MLVA, 31 aislados ECVT de distintos orígenes en México, entre los que había seis ECVT O157:H7 procedentes de ganado bovino de un mismo matadero. Todos los aislados ECVT O157:H7 menos uno, con tres VNTR de varias repeticiones de diferencia, serían clasificados como un mismo clon aplicando los criterios del presente trabajo.

En 2018, Nakamura *et al.* estudiaron la clonalidad de 73 aislados ECVT de distintos serotipos obtenidos a partir de heces de bovino mediante la técnica de MLVA con el protocolo descrito por Lindstedt *et al.* (2007), y compararon los resultados con las técnicas PFGE y MLST. Entre los aislados analizados incluyeron nueve ECVT O157:H7 con relación epidemiológica conocida. Al igual que los resultados observados en el presente trabajo, establecieron las mismas relaciones clonales empleando las técnicas de PFGE y MLVA.

Los resultados obtenidos al secuenciar los productos de PCR correspondientes a la cepa EDL933 no coincidieron con los descritos por Lindstedt *et al.* (2007) obtenidos a partir de la secuencia del genoma completo de la cepa EDL933 (número de acceso a GenBank: AE005174). Este hecho no resulta sorprendente, ya que se han descrito en varias publicaciones distintos perfiles de la técnica de MLVA para esta cepa empleando éste (Lindstedt *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2009b) y otros protocolos (Lindstedt *et al.*, 2003; Keys *et al.*, 2005; Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2011) e

incluso haciendo análisis *in silico* a partir de la secuencia del genoma completo de la cepa EDL933 (Bustamante *et al.*, 2013). Estas diferencias pueden deberse a la presencia de cambios espontáneos en el genoma de la cepa de referencia a causa de variaciones en la temperatura de conservación y al número de ciclos de congelación-descongelación y pases sucesivos a los que se ha visto expuesta esta cepa o la alta tasa de mutación detectada en algunas de sus VNTR (Bustamante *et al.*, 2013). Estos problemas ya han sido resaltados a partir de la experiencia de estudios entre laboratorios para la estandarización de protocolos de la técnica de MLVA (Holmes *et al.*, 2015). De hecho, en posteriores trabajos del grupo de investigación de Lindstedt han empleado otras cepas de referencia como la cepa HS de *E. coli* (número de acceso a GenBank: CP000802), ya que el aislado de la cepa EDL933 que tenían en el laboratorio presentaba variaciones con respecto a la secuencia depositada en GenBank.

El número de repeticiones en tándem se estimó a partir de los resultados obtenidos en la cepa control. Al no haber realizado la secuenciación tipo Sanger de todos los productos de PCR obtenidos para cada aislado, asumimos el riesgo de que alguno de estas estimaciones pueda no coincidir con el número real de repeticiones en una VNTR. No obstante, en la bibliografía consultada es infrecuente observar estas discrepancias a la hora de determinar el número de repeticiones de una VNTR. De hecho, la mayoría de los protocolos de la técnica de MLVA propuestos emplean, igual que en el presente trabajo, la electroforesis capilar o la electroforesis en geles de agarosa o acrilamida (Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Lindstedt *et al.*, 2007; Kawamori *et al.*, 2008; Løbersli *et al.*, 2012).

Al aplicar el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* (2007) sobre la colección de aislados estudiados, se obtuvo el valor de ID más elevado en la VNTR CVN014, lo cual concuerda con lo descrito previamente por otros autores (Bustamante *et al.*, 2009b, 2012; Jenke *et al.*, 2011; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2015). Por el contrario, la menor ID se obtuvo en las VNTR CVN001 y CVN015, lo cual concuerda de nuevo con los estudios previos revisados (Bustamante *et al.*, 2009b, 2012; Jenke *et al.*, 2011; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2015). Al comparar los IDs obtenidos con los observados en el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.*, se aprecia la existencia de algunas VNTR con bajo valor de ID entre los aislados de *E. coli* O157:H7. Sin duda, este hecho es debido a que el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) fue diseñado para la subtipificación de aislados de *E. coli* en general, independientemente de su serotipo, a diferencia del protocolo para esta técnica de Noller *et al.*, diseñado para la subtipificación de *E. coli* O157:H7. Esta selección de VNTR más generalista permite su aplicación en un amplio espectro de serotipos de *E. coli*, perdiendo capacidad de discriminación en serotipos concretos. Por ejemplo, esto sucede en serotipos como O20:H19, O91:H21, O113:H21, O117:H7, O145:H-, O171:H2, O174:H21

Discusión

(Bustamante *et al.*, 2009b; Sanso *et al.*, 2018), y en menor medida, en el O157:H7, tal y como describen Bustamante *et al.* (2009b). Este hecho también se observó en nuestros resultados, ya que al emplear el protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) se obtuvo un menor poder de discriminación con respecto al protocolo de Noller *et al.* (2003). A pesar de ello, como demuestran distintos autores (Lindstedt *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2009b) y se observó en el presente trabajo (datos no mostrados), este protocolo de la técnica de MLVA dispone de poder de discriminación suficiente para clasificar todos los aislados del serotipo O157:H7 en un clúster distinto con respecto al resto.

En la tercera parte de este estudio se evaluó el análisis combinado de las técnicas empleadas (PFGE y los protocolos de MLVA estudiados) con respecto a la técnica de PFGE sola, para la subtipificación genotípica de 63 aislados de *E. coli* O157:H7 de origen animal y humano, con y sin relación epidemiológica conocida. Con los criterios aplicados en el presente trabajo, la combinación de la técnica de PFGE y el protocolo de la técnica de MLVA de Noller *et al.* (2003) fue la que ofreció mejoras con respecto al análisis de la subtipificación de aislados mediante la técnica de PFGE sola. Si bien el uso combinado de ambas técnicas no supuso mejora con respecto a la técnica de PFGE sola en la clasificación de los aislados *E. coli* O157:H7 con información epidemiológica disponible, el uso combinado de ambas técnicas sí ofreció una mejor clasificación de los aislados sin información epidemiológica disponible, aumentando el número de perfiles obtenidos. Ello supuso un incremento en el poder de discriminación de la combinación de las técnicas PFGE y MLVA con el protocolo de Noller *et al.* (2003) con respecto a la técnica de PFGE sola.

Además de los casos ya descritos en los que se obtuvieron resultados similares, en 2016, Rumore *et al.* ya destacaron esta capacidad de la técnica de MLVA para refinar los resultados de la técnica de PFGE en la subtipificación genotípica de aislados de *E. coli* O157:H7. En concreto, el uso de la técnica de MLVA con un protocolo que incluye las VNTR descritas por Noller *et al.* (2003) y dos VNTR más (VNTR-36 y VNTR37) además de la técnica de PFGE, si bien estableció prácticamente las mismas relaciones clonales que la técnica de PFGE sola, permitió excluir aislados sin relación epidemiológica en cerca de un 28% de los brotes estudiados. Estos resultados son coherentes con trabajos previos, que destacan la utilidad de la técnica de MLVA con protocolos que incluyen las VNTR descritas por Noller *et al.* (2003), para discriminar entre aislados no relacionados epidemiológicamente (Keys *et al.*, 2005; Hyytiä-Trees *et al.*, 2006; Izumiya *et al.*, 2010; Konno *et al.*, 2011). Estos resultados indican la aplicabilidad de la técnica por sí misma e incluso la conveniencia de su uso en combinación con la técnica de PFGE para facilitar la subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7.

En la cuarta parte de este estudio, se evaluó la aplicabilidad del protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) para la subtipificación genotípica de 115 aislados ECVT de los serogrupos O5, O91 y O146, todos de origen ovino, con relación epidemiológica conocida (aislados de una misma explotación y de un mismo animal dentro de la explotación) y sin relación epidemiológica conocida (aislados de distintas explotaciones). Con los criterios aplicados en el presente trabajo, tanto la técnica de MLVA, con el protocolo empleado, como la técnica de PFGE establecieron relaciones clonales entre aislados de distintas explotaciones no explicables con la información existente. Dentro de una misma explotación, cuando mediante la técnica de PFGE se identificaron uno o más clones entre los aislados con información epidemiológica disponible, el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* (2007) fue incapaz de establecer las mismas relaciones clonales entre los aislados. No obstante, la técnica de MLVA, con el protocolo empleado, fue capaz de agrupar los aislados obtenidos a partir de un mismo animal de forma secuencial en un mismo clon, tal y como lo hizo la técnica de PFGE.

Los serogrupos O5, O91 y O146 han sido relacionados con brotes de enfermedad en seres humanos en Europa (EFSA, 2013; EFSA and ECDC, 2018) y España (Mora *et al.*, 2011). Según la bibliografía consultada, estos serogrupos han sido estudiados con la técnica de MLVA incluidos en colecciones de aislados, pero en escaso número (menos de cinco aislados) (Bustamante *et al.*, 2009b, 2012; Döpfer *et al.*, 2010; Jenke *et al.*, 2011; Amézquita-López *et al.*, 2012; Cooley *et al.*, 2013; González *et al.*, 2014; Haugum *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014c, 2014b; Wang *et al.*, 2017; Nakamura *et al.*, 2018). Tan sólo un estudio realizado por Hernández *et al.* en 2018 empleó el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* (2007) para la subtipificación de una colección de 22 aislados ECVT O91.

Entre los resultados obtenidos, se observó la ausencia de amplificación de la VNTR CVN003 en todos los aislados de ECVT de los tres serogrupos estudiados. Hernández *et al.* (2018) también han observado recientemente dicha ausencia en ECVT O91 procedentes de ganado bovino y carne de origen bovino y aviar. De hecho, tal y como se observa en la **Tabla 24**, esta ausencia de amplificación de CVN003 ha sido destacada con frecuencia en la bibliografía. Ya en 2007, Lindstedt *et al.*, al publicar su protocolo, apreciaron que esta VNTR no amplificaba en aislados de algunos serotipos, situación que fue confirmada en la posterior publicación de Løbersli *et al.* (2012), donde destacaron que CVN003 amplificó en serotipos concretos como O145:H8, O55:H7 y O157:H7. En este sentido, Sekse *et al.* (2011), Brandal *et al.* (2012) y Krüger *et al.* (2015) fueron incapaces de amplificar CVN003 en aislados del serotipo O26:H11, si bien Miko *et al.* (2009) sí lo consiguieron en el serotipo

Discusión

O26:H32. Ello supone que CVN003 sea de utilidad sólo para la subtipificación de serotipos concretos de *E. coli*.

Además, otros autores observaron ausencia de amplificación de otras VNTR de este protocolo cuando se ha aplicado en aislados de ECVT no-O157 (Bustamante *et al.*, 2009b, 2012; Prager *et al.*, 2011; Amézquita-López *et al.*, 2012; González *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014c; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2015; Timmons *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha destacado la ausencia de amplificación de CVN007 en aislados O103 (Lindstedt *et al.*, 2007; Schimmer *et al.*, 2008), O113 (Sanso *et al.*, 2018), O117 y O174 (Bustamante *et al.*, 2009b), así como de CVN002 en aislados de O20 (Bustamante *et al.*, 2009b) y de CVN0014 en aislados del serotipo O130:H11 (Fernández *et al.*, 2013).

Tabla 24. Referencias bibliográficas, serogrupos y antígeno H de *E. coli* en los que se ha estudiado la amplificación en la VNTR CVN003.

¿Amplifica CVN003?	Serogrupo	Antígeno H	Referencia
No	ONT	NT/NM*/H2/H4*/H6/H7/H8/H10*/H12/H16*/H19/H21/H34*/H40/ H42/H45/H51	(Prager <i>et al.</i> , 2011; Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012; Bustamante <i>et al.</i> , 2012; González <i>et al.</i> , 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2017)
	OR*	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O1	NT	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O2	NM/H25	(Prager <i>et al.</i> , 2011; González <i>et al.</i> , 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O3	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O5	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O8	NT/H12/H16/H19/H25/H40	(Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012; Bustamante <i>et al.</i> , 2012; González <i>et al.</i> , 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O11	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O12	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O15*	NM/NT/H16	(Prager <i>et al.</i> , 2011; Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012)
	O18	NT/H9/H12/H21	(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O20*	NT/H12/H19	(Bustamante <i>et al.</i> , 2009b, 2012; González <i>et al.</i> , 2014; Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O21	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O22*	H8	(Bustamante <i>et al.</i> , 2012; González <i>et al.</i> , 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O25	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O26*	NM/H11/H32*	(Miko <i>et al.</i> , 2010; Sekse <i>et al.</i> , 2011; Brandal <i>et al.</i> , 2012; Krüger <i>et al.</i> , 2015)
	O27	NM	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O28*	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
O30	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)	
O33	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)	
O35	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)	

Discusión

¿Amplifica CVN003?	Serogrupo	Antígeno H	Referencia
	O37	H10	(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O40	NM	(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O41	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O43	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O48	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O52	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O55*	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O60	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O63	H42	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O64	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O69	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O73*	NT	(Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012)
	O74	NT	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O75	H8	(Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012)
	O76	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O79	H19	(González <i>et al.</i> , 2014)
	O85*	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O88	H21	(González <i>et al.</i> , 2014)
	O91	NT/H8/H14/H21/H28/H40	(Bustamante <i>et al.</i> , 2009b, 2012; González <i>et al.</i> , 2014; Wang <i>et al.</i> , 2017; Hernández <i>et al.</i> , 2018)
	O93	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O95	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O97	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O102	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O103	NT/H2/H25	(Schimmer <i>et al.</i> , 2008; Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Wang <i>et al.</i> , 2017)

¿Amplifica CVN003?	Serogrupo	Antígeno H	Referencia
	O104	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O110*	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O111	H8	(Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012)
	O112**	H2/H21**	(Bustamante <i>et al.</i> , 2012; González <i>et al.</i> , 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O113	NM/H2/H21	(Bustamante <i>et al.</i> , 2009b, 2012; González <i>et al.</i> , 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Sanso <i>et al.</i> , 2018)
	O115	NT	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O116	H21	(González <i>et al.</i> , 2014)
	O117	H4/H7	(Bustamante <i>et al.</i> , 2009b, 2012; González <i>et al.</i> , 2014)(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O118	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O119	H45	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O126	NT	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O127	NT	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O130	H11	(Bustamante <i>et al.</i> , 2012; Fernández <i>et al.</i> , 2013)
	O136***	NM/H12/H16***	(Prager <i>et al.</i> , 2011; Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O141	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O146	H8/H21	(Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012)
	O152	H12	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O153	H9	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O154	H53	(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O165	H16	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O168	NT	(Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012; Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O171	NM/NT/H2	(Bustamante <i>et al.</i> , 2009b, 2012; González <i>et al.</i> , 2014)
	O172	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)

Discusión

¿Amplifica CVN003?	Serogrupo	Antígeno H	Referencia
	O173	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O174	H21	(Bustamante <i>et al.</i> , 2009b, 2012; González <i>et al.</i> , 2014)
	O175	H28	(Prager <i>et al.</i> , 2011)
	O178	H19	(Bustamante <i>et al.</i> , 2012; Fernández <i>et al.</i> , 2013; González <i>et al.</i> , 2014)
	O185	H7	(González <i>et al.</i> , 2014; Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
Si	ONT*	NM*/H4*/H10/H16/H34/H41	(Prager <i>et al.</i> , 2011; Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012; Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Wang <i>et al.</i> , 2017)
	OR*	H7	(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O7	H30	(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O15*	H6	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O20*	H4	(Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012)
	O22*	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O26*	H32*	(Miko <i>et al.</i> , 2010)
	O28*	H16	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O55*	H7	(Løbersli <i>et al.</i> , 2012)
	O73	H4	(Amézquita-López <i>et al.</i> , 2012)
	O85	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O110*	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)
	O118*	H21	(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O124	NT	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O136*/** *	H16*/***	(Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)
	O145	NM/H8	(Bustamante <i>et al.</i> , 2009b, 2012; Løbersli <i>et al.</i> , 2012)
	O148	NT	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O157	H7	(Bustamante <i>et al.</i> , 2009b, 2012; González <i>et al.</i> , 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2014c; Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015)

¿Amplifica CVN003?	Serogrupo	Antígeno H	Referencia
	O158	H9	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	O165	No analizado	(Kumar <i>et al.</i> , 2014c)

NT: No tipable y NM: antígeno H ausente (no móvil)

Los serotipos de *E. coli* de la colección ECOR empleados en la publicación de Lindstedt *et al.* (2007) no se incluyen en la tabla.

*En estos serogrupos/serotipos de *E. coli*, tanto la presencia como la ausencia de amplificación en CVN003, ha sido observada en la bibliografía consultada.

**Aparece en el texto de la publicación de González *et al.* (2014), pero no coincide con los datos presentados en la figura 1 (Dendrograma) del mismo trabajo.

***Aparece en el texto de la publicación de Reyes-Rodríguez *et al.* (2015), pero no coincide con los datos presentados en la figura 1 (Dendrograma) del mismo trabajo.

Discusión

Al aplicar el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* (2007) sobre la colección de aislados estudiados, se obtuvo el valor de ID más elevado en VNTR CVN014, tal y como se observó entre los aislados de *E. coli* O157:H7 en el presente trabajo, circunstancia ya señalada por otros autores (Keys *et al.*, 2005; Lindstedt *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2009b, 2012; Miko *et al.*, 2010; Sekse *et al.*, 2011; Franci *et al.*, 2011; González *et al.*, 2014; Krüger *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2018; Sanso *et al.*, 2018). Por el contrario, el menor ID se observó en las VNTR CVN002 y CVN015. En este caso, hay disparidad de resultados en la bibliografía consultada, ya que según el origen y serogrupo de los aislados analizados la VNTR con menor ID varió. No obstante, ambas suelen aparecer entre las que menor diversidad ofrecieron en los distintos trabajos que han empleado este protocolo de la técnica de MLVA (Bustamante *et al.*, 2009b; Franci *et al.*, 2011; Jenke *et al.*, 2011; Amézquita-López *et al.*, 2012; González *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2018).

El poder de discriminación de la técnica de MLVA con el protocolo empleado fue inferior al de la técnica de PFGE, y se obtuvieron 20 perfiles distintos entre los 115 aislados de ECVT estudiados. Esto fue debido al escaso ID de las VNTR de este protocolo de la técnica de MLVA, ya que, a excepción de VNTR CVN014, se observaron pocas diferencias entre los aislados analizados, hecho que dificultó el análisis de las relaciones clonales entre los mismos. Además, esta escasa diversidad, impidió separar en distintos clústeres los tres serogrupos analizados. Tan solo los aislados de ECVT O91 fueron clasificados aparte, ya que se identificaron perfiles indistinguibles entre aislados de ECVT O5 y de ECVT O146 (C4-A4 y C3-A1).

La escasa diversidad que ofrece este protocolo de la técnica de MLVA en algunos serogrupos ya ha sido destacada por algunos autores. Recientemente, Sanso *et al.* (2018), en un estudio realizado con 34 aislados de ECVT O113:H21, encontraron que la mayoría de los perfiles presentaba poca variación, con cambios tan solo debidos a la VNTR CVN014. Por su parte, Hernández *et al.* (2018), en un estudio realizado con 22 aislados de ECVT O91, aunque obtuvieron diferentes perfiles de MLVA, éstos se diferenciaron en muchos casos debido a SLV de una sola repetición en la misma VNTR. Igualmente, la incapacidad de este protocolo de la técnica de MLVA para diferenciar entre serogrupos ya ha sido observada por otros autores previamente (Döpfer *et al.*, 2010; Franci *et al.*, 2011; Jenke *et al.*, 2011; Prager *et al.*, 2011; González *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014c).

Debido a resultados similares observados por otros autores, en 2012, Løbersli *et al.* incorporaron dos VNTR adicionales (CVN016 y CVN017) al protocolo de la técnica de MLVA descrito por Lindstedt *et al.* (2007), además de una secuencia CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, del inglés: *clustered regularly interspaced short*

palindromic repeat). Ello permitió incrementar el poder de discriminación de este protocolo de la técnica de MLVA, especialmente en los serogrupos O55, O103, O145 y O157 (Løbersli *et al.*, 2012). No obstante, esta mejora no se observó en algunos casos ni para CVN017, ni para el CRISPR (Amézquita-López *et al.*, 2012). Concretamente, no se obtiene producto para CVN017 en O113 (Sanzo *et al.*, 2018) ni en O91 (Hernández *et al.*, 2018), así como en muchos otros serogrupos (González *et al.*, 2014; Timmons *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Estas experiencias sugieren que para garantizar un mayor poder de discriminación habría de diseñar protocolos específicos de la técnica de MLVA para distintos conjuntos de serogrupos de *E. coli* no O157, lo cual limita mucho su aplicación.

La técnica de MLVA ha resultado una herramienta útil para establecer las rutas de diseminación y patrones de excreción, subtipificar cepas de ECVT O157:H7 obtenidas de distintas especies animales y realizar estudios longitudinales en explotaciones tanto de ganado bovino como ovino (Murphy *et al.*, 2008; Urdahl *et al.*, 2008; Kondo *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2017). En el caso de ECVT no-O157, según la bibliografía consultada, la técnica no ha sido empleada para realizar estudios longitudinales. No obstante, algunas publicaciones sí que han subtipificado aislados de ECVT no-O157 de origen animal, obtenidos en distintas granjas o localizaciones, empleando la técnica de MLVA con el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007) o con las modificaciones propuestas por Løbersli *et al.* (2012). En 2011, Sekse *et al.* aplicaron la técnica de MLVA sobre 129 aislados del serotipo O26:H11, procedentes de 80 explotaciones ovinas de Noruega, y compararon los resultados con los obtenidos mediante la técnica de PFGE. A pesar de ser un serogrupo distinto a los estudiados en el presente trabajo, aplicando los mismos criterios de interpretación de las técnicas, los resultados que obtuvieron fueron similares. Por un lado, observaron poca diversidad de perfiles de MLVA entre los aislados de ECVT, en concreto, 16 perfiles con SLV o DLV en la VNTR CVN0014, principalmente. Por otro lado, ambas técnicas establecieron relaciones clonales entre aislados de distintas explotaciones no explicables con la información existente. Finalmente, dentro de una misma explotación, cuando identificaron mediante la técnica de PFGE uno o más clones entre los aislados con información epidemiológica disponible, el protocolo de la técnica de MLVA empleado fue incapaz de establecer las mismas relaciones clonales.

En 2012, Amézquita-López *et al.* aplicaron las técnicas MLVA y PFGE, empleando dos enzimas de restricción, sobre 37 aislados de ECVT de distintos serotipos, de origen ovino y bovino, obtenidos a partir de cinco lugares de muestreo. Dentro de los serotipos estudiados, analizaron cuatro aislados del serotipo O146:H21. De nuevo, obtuvieron resultados similares. Empleando los mismos criterios de interpretación que en el presente trabajo, ambas técnicas establecieron relaciones

Discusión

clonales entre aislados, del mismo serotipo y de serotipos distintos, no explicables con la información existente. De forma análoga a lo obtenido en el presente trabajo, entre puntos de muestreo distantes y sin aparente relación, cuando la técnica de PFGE identificó clones distintos entre aislados de un mismo serotipo (como por ejemplo en aislados ECVT del serotipo O146:H21), la técnica de MLVA fue incapaz de diferenciarlos. Además, entre aislados de un mismo punto de muestreo y mismo serotipo, la técnica de MLVA fue incapaz de diferenciar aislados pertenecientes a clones distintos según la técnica de PFGE.

Fernández *et al.* (2013) estudiaron, mediante la técnica de MLVA, 37 aislados de ECVT O130:H11 y 25 aislados de ECVT O178:H19 obtenidos a partir de bovino lechero de cinco granjas sin aparente relación epidemiológica. Los resultados observados son similares a los del presente trabajo. En concreto, los autores encontraron una escasa diversidad de perfiles entre los aislados estudiados. En los aislados de ECVT O130:H11 sólo observaron un perfil de MLVA (5-2-30-9-8-30-6), por lo que, según los autores, este protocolo no parece ser indicado para la subtipificación de este serotipo. Entre los aislados ECVT O178:H9, aplicando los criterios empleados en el presente trabajo, la técnica de MLVA con el protocolo de Lindstedt *et al.* (2007) clasificaría todos los aislados como pertenecientes a un mismo clon, independientemente de su granja de origen, ya que los perfiles se distinguen únicamente por SLV o DLV en las VNTR CVN001, CVN004 y CVN014. Por lo que, de nuevo, los resultados indican que el protocolo empleado tampoco sería adecuado para la subtipificación de aislados ECVT O178:H9.

A tenor de los resultados obtenidos, cabe resaltar que ambos protocolos de la técnica de MLVA empleados para la subtipificación de *E. coli* O157 han demostrado su aplicabilidad en aislados con información epidemiológica disponible, siendo capaces de establecer las mismas relaciones clonales que la técnica de PFGE. Además, la aplicación conjunta de ambas técnicas ofreció una mejor clasificación de los aislados sin información epidemiológica disponible, en especial el protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller *et al.* en 2003. Por el contrario, según los resultados obtenidos, la técnica de MLVA con el protocolo empleado no es aplicable para la subtipificación de aislados ECVT de los serogrupos O5, O91 y O146. La escasa diversidad observada entre las VNTR que componen el protocolo de la técnica de MLVA empleado dio como resultado una falta de poder de discriminación de la técnica, que fue incapaz de establecer las mismas relaciones clonales que la técnica de PFGE entre aislados de una misma explotación. No obstante, la técnica de MLVA fue capaz de agrupar los aislados obtenidos a partir de un mismo animal de forma secuencial en un mismo clon, tal y como lo hizo la técnica de PFGE. Con la bibliografía consultada y los resultados observados parece evidente que para poder subtipificar aislados ECVT

no O157 empleando la técnica de MLVA, sería necesario ensayar protocolos con nuevas VNTR más apropiadas y específicas capaces de discriminar en un amplio rango de serogrupos o incluso serotipos de ECVT. Esta selección puede hacerse en la actualidad gracias a la generalización de nuevas técnicas como la WGS, ya que se dispone de una mayor cantidad de genomas completos de *E. coli* de distintos serogrupos.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El presente trabajo confirma la aplicabilidad de la técnica de MLVA, con los protocolos empleados, para la subtipificación de aislados de *E. coli* O157:H7 de origen animal y humano con y sin relación epidemiológica conocida, así como para el establecimiento de las relaciones clonales existentes entre ellos.
2. El protocolo de la técnica de MLVA descrito por Noller *et al.* (2003) puede ser empleado en paralelo al PFGE para aumentar el poder de discriminación del mismo, permitiendo establecer relaciones clonales más coherentes con la información epidemiológica disponible o en ausencia de dicha información.
3. El protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) empleado para la subtipificación de ECVT no-O157 de los serogrupos O5, O91 y O146 no permite una discriminación apropiada para su aplicación sistemática en la subtipificación genotípica aislados de origen animal con y sin relación epidemiológica, ni para establecer las relaciones clonales existentes entre ellos.
4. No obstante, a pesar del escaso poder de discriminación, este protocolo de la técnica de MLVA ha permitido el seguimiento de aislados de ECVT de los serogrupos O5, O91 y O146 obtenidos de manera secuencial a partir de un mismo individuo.
5. Las limitaciones observadas en el uso del protocolo de la técnica de MLVA de Lindstedt *et al.* (2007) para la subtipificación genotípica de aislados ECVT no-O157 podrían superarse con la selección de nuevas VNTRs capaces de discriminar específicamente en cada serotipo. En este sentido, la generalización de la secuenciación masiva, a la que estamos asistiendo en estos últimos años, y la consiguiente publicación de genomas completos de aislados de *E. coli* de diferentes serotipos en repositorios de acceso libre, facilitarán esta labor en un futuro próximo.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051565>
- Andreoli, S.P., Trachtman, H., Acheson, D.W., Siegler, R.L., Obrig, T.G.**, 2002. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatric Nephrology*. 17 (4): 293–298.
- Anónimo**, 2001. Brot de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 en diferents escoles de Catalunya. *Butlletí Epidemiològic de Catalunya*. 22 : 59–64.
- 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. *Journal of Food Protection*. 70 (7): 1622–1626.
- Bachmann, B.J.**, 1972. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological Reviews*. 36 (4): 525–557.
- Bardiau, M., Grégoire, F., Muylaert, A., Nahayo, A., Duprez, J.N., Mainil, J., Linden, A.**, 2010. Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids. *Journal of Applied Microbiology*. 109 (6): 2214–2222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04855.x>
- 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 multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (12): 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 Pathogens and Disease*. 3 (1): 20–31.

Bibliografía

- Beddoe, T., Paton, A.W., Le Nours, J., Rossjohn, J., Paton, J.C.**, 2010. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends in Biochemical Sciences*. 35 (7): 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.02.003>
- Berenger, B.M., Berry, C., Peterson, T., Fach, P., Delannoy, S., Li, V., Tschetter, L., Nadon, C., Honish, L., Louie, M., Chui, L.**, 2015. The utility of multiple molecular methods including whole genome sequencing as tools to differentiate *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks. *Eurosurveillance*. 20 (47): 1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.47.30073>
- Berg, R.D.**, 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*. 4 (11): 430–435.
- Bergan, J., Dyve Lingelem, A.B., Simm, R., Skotland, T., Sandvig, K.**, 2012. Shiga toxins. *Toxicon*. 60 (6): 1085–1107. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.016>
- Bertin, Y., Boukhors, K., Pradel, N., Livrelli, V., Martin, C.**, 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (9): 3060–3065.
- Beutin, L., Bode, L., Ozel, M., Stephan, R.**, 1990. Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strains. *Journal of Bacteriology*. 172 (11): 6469–6475.
- Beutin, L., Martin, A.**, 2012. Outbreak of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 Infection in Germany Causes a Paradigm Shift with Regard to Human Pathogenicity of STEC Strains. *Journal of Food Protection*. 75 : 408–418. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-452>
- Bielaszewska, M., Idelevich, E.A., Zhang, W., Bauwens, A., Schaumburg, F., Mellmann, A., Peters, G., Karch, H.**, 2012. Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56 (6): 3277–3282. <https://doi.org/10.1128/AAC.06315-11>

- Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Aldick, T., Schurk-Bulgrin, R., Karch, H.,** 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clinical Infectious Diseases*. 43 (9): 1160–1167. <https://doi.org/10.1086/508195>
- 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. *Experimental Biology and Medicine*. 228 (4): 345–351.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Molinero, M.E., Peiró, E., Mora, A., Blanco, J.,** 1996. Brote de gastroenteritis asociado con un *Escherichia coli* verotoxigénico (ECVT) O111:H- VT1+ eae+. *Alimentaria*. 275 : 110–113.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (1): 311–319.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P., González, E.A., Bernárdez, M.I., Blanco, J.,** 2004. 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-ξ*). *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (2): 645–651.
- 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-η2*). *BMC Microbiology*. 5 (1): 23.

Bibliografía

- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997.** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277 (5331): 1453–1474.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (3): 497–503.
- Böhm, H., Karch, H., 1992.** DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 30 (8): 2169–2172.
- Börjesson, S., Guillard, T., Landén, A., Bengtsson, B., Nilsson, O., 2016.** Introduction of quinolone resistant *Escherichia coli* to Swedish broiler population by imported breeding animals. *Veterinary Microbiology*. 194 : 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.004>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02833-10>
- Brandal, L.T., Sekse, C., Lindstedt, B.A., Sunde, M., Løbersli, I., Urdahl, A.M., Kapperud, G., 2012.** Norwegian sheep is an important reservoir for human pathogenic *Escherichia coli* O26:H11. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (12): 4083–4091. <https://doi.org/AEM.00186-12> [pii] 10.1128/AEM.00186-12
- Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Bohmer, M.M., Remschmidt, C., Wilking, H., Delere, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., Ehlers, J., Ethelberg, S., Faber, M., Frank, C., Fricke, G., Greiner, M., Hohle, M., Ivarsson, S., Jark, U., Kirchner, M., Koch, J., Krause, G., Lubber, P., Rosner, B., Stark, K., Kuhne, M., 2011.** German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *New England Journal of Medicine*. 365 (19): 1763–1770. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106482>

- Bustamante, A. V., Lucchesi, P.M.A., Parma, A.E.,** 2009a. Molecular characterization of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 isolates from Argentina by multiple-loci vntr analysis (MLVA). *Brazilian Journal of Microbiology.* 40 (4): 927–932. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400026>
- Bustamante, A. V., Sanso, A.M., Lucchesi, P.M., Parma, A.E.,** 2009b. Genetic diversity of O157:H7 and non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* from Argentina inferred from multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). *International Journal of Medical Microbiology.* 300 (4): 212–217. [https://doi.org/S1438-4221\(09\)00116-7](https://doi.org/S1438-4221(09)00116-7) [pii] 10.1016/j.ijmm.2009.08.020
- Bustamante, A. V., Sanso, A.M., Parma, A.E., Lucchesi, P.M.A.,** 2012. Subtyping of STEC by MLVA in Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2 (111): 1–4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00111>
- Bustamante, A. V., Sanso, A.M., Segura, D.O., Parma, A.E., Lucchesi, P.M.A.,** 2013. Dynamic of mutational events in variable number tandem repeats of *Escherichia coli* O157:H7. *BioMed Research International.* A.ID390354 : 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/390354>
- 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. *Epidemiology and Infection.* 144 : 2812–2823. <https://doi.org/10.1017/S0950268816000509>
- Byres, E., Paton, A.W., Paton, J.C., Löfling, J.C., Smith, D.F., Wilce, M.C.J., Talbot, U.M., Chong, D.C., Yu, H., Huang, S., Chen, X., Varki, N.M., Varki, A., Rossjohn, J., Beddoe, T.,** 2008. Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature.* 456 (7222): 648–652. <https://doi.org/10.1038/nature07428>

Bibliografía

- Byrne, L., Elson, R., Dallman, T.J., Perry, N., Ashton, P., Wain, J., Adak, G.K., Grant, K.A., Jenkins, C.,** 2014. Evaluating the use of multilocus variable number tandem repeat analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 as a routine public health tool in England. PLoS ONE. 9 (1): e85901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085901>
- Caméléna, F., Birgy, A., Smail, Y., Courroux, C., Mariani-Kurkdjian, P., Le Hello, S., Bonacorsi, S., Bidet, P.,** 2019. Rapid and simple universal *Escherichia coli* genotyping method based on Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeats Analysis using single-tube multiplex PCR and standard gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 6 : 85. <https://doi.org/10.1128/AEM.02812-18>
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., Oswald, E.,** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Veterinary Research. 36 (3): 289–311.
- Caron, E., Crepin, V.F., Simpson, N., Knutton, S., Garmendia, J., Frankel, G.,** 2006. Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. Current Opinion in Microbiology. 9 (1): 40–45.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention),** 2017. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) National Surveillance Annual Summary, 2015. Atlanta, Georgia.
- Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., Frankel, G.,** 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes. 3 (2): 71–87. <https://doi.org/10.4161/gmic.19182>
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. (Eds.),** 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Conradi, H.,** 1903. Über lösliche durch durch aseptische autolyse, erhaltene giftstoffe von ruhr- und typhus bazillen. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 29 : 26–28.
- Conway, T., Krogfelt, K.A., Cohen, P.S.,** 2004. The Life of Commensal *Escherichia coli* in the Mammalian Intestine. EcoSal Plus. 1 (1): 1–15.

- Cooley, M., Carychao, D., Crawford-Miksza, 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.
- Cooley, M.B., Carychao, D., Nguyen, K., Whitehand, L., Mandrell, R.,** 2010. Effects of environmental stress on stability of tandem repeats in *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology. 76 (10): 3398–3400. <https://doi.org/10.1128/AEM.02373-09>
- Cooley, M.B., Jay-Russell, M., Atwill, E.R., Carychao, D., Nguyen, K., Quiñones, B., Patel, R., Walker, S., Swimley, M., Pierre-Jerome, E., Gordus, A.G., Mandrell, R.E.,** 2013. Development of a Robust Method for Isolation of Shiga Toxin-Positive *Escherichia coli* (STEC) from Fecal, Plant, Soil and Water Samples from a Leafy Greens Production Region in California. PLoS ONE. 8 (6): e65716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065716>
- Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Dhabí, 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. Veterinary Microbiology. 110 (1–2): 67–76.
- 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. Clinical Infectious Diseases. 61 (3): 305–312. <https://doi.org/10.1093/cid/civ318>
- DeGrandis, S., Law, H., Brunton, J., Gyles, C., Lingwood, C.A.,** 1989. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. Journal of Biological Chemistry. 264 (21): 12520–12525.
- Delahay, R.M., Frankel, G., Knutton, S.,** 2001. Intimate interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface. Current Opinion in Infectious Diseases. 14 (5): 559–565. <https://doi.org/10.1097/00001432-200110000-00009>

Bibliografía

- Delannoy, S., Mariani-Kurkdjian, P., Bonacorsi, S., Liguori, S., Fach, P.,** 2015. Characteristics of emerging human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated in France between 2010 and 2013 and carrying the *stx2d* gene only. *Journal of Clinical Microbiology*. 53 (2): 486–492. <https://doi.org/10.1128/JCM.02290-14>
- Díaz-Sánchez, S., Sánchez, S., Sánchez, M., Herrera-León, S., Hanning, I., Vidal, D.,** 2012. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in game meat and ready-to-eat meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 160 (2): 179–182. [https://doi.org/S0168-1605\(12\)00509-0](https://doi.org/S0168-1605(12)00509-0) [pii] 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.016
- Donnenberg, M.S., Whittam, T.S.,** 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*. 107 (5): 539–548. <https://doi.org/10.1172/JCI12404>
- Döpfer, D., Sekse, C., Beutin, L., Solheim, H., Van Der Wal, F.J., De Boer, A., Slettemeås, J.S., Wasteson, Y., Urdahl, A.M.,** 2010. Pathogenic potential and horizontal gene transfer in ovine gastrointestinal *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 108 (5): 1552–1562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04575.x>
- Dyet, K.H., Robertson, I., Turbitt, E., Carter, P.E.,** 2011. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in New Zealand using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Epidemiology and Infection*. 139 (3): 464–71. <https://doi.org/10.1017/S0950268810001068>
- EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control),** 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *The EFSA Journal*. 9 (3:2090): 378. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2090>
- EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC, (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. *The EFSA Journal*. 10 (3): 1–442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2597>

- EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control),** 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. The EFSA Journal. 11 (4:3129): 250. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3129>
- EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control),** 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. The EFSA Journal. 12 (2:3547): 312. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>
- EFSA, (European Food Safety Authority),** 2013. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. The EFSA Journal. 11 (4:3138): 106. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3138>
- EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control),** 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal. 13 (1:3991): 162. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control),** 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. The EFSA Journal. 15 (12): 5077, 228 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control),** 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal. 16 (12): 5500, 262p. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Eklund, M., Leino, K., Siitonen, A.,** 2002. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. Journal of Clinical Microbiology. 40 (12): 4585–4593.

Bibliografía

- Eriksson, E., Söderlund, R., Boqvist, S., Aspan, A.,** 2011. Genotypic characterization to identify markers associated with putative hypervirulence in Swedish *Escherichia coli* O157:H7 cattle strains. *Journal of Applied Microbiology*. 110 (1): 323–332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04887.x>
- Escherich, T.,** 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und des Säuglings. *Fortschritte der Medizin*. 3 : 515–522.
- Ewing, W.H.,** 1986. The genus *Escherichia*, in: Ewing, W.H., Edward, P.R. (Eds.), *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. Elsevier, New York, pp. 93–134.
- Fernández, D., Krüger, A., Polifroni, R., Bustamante, A. V., Sanso, A.M., Etcheverría, A.I., Lucchesi, P.M.A., Parma, A.E., Padola, N.L.,** 2013. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3 (9): 1–6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00009>
- 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. *Epidemiology and Infection*. 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*. *Infection and Immunity*. 64 (6): 2256–2265.
- Franci, T., Sanso, A.M., Bustamante, A. V., Lucchesi, P.M.A., Parma, A.E.,** 2011. Genetic Characterization of Non-O157 Verocytotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Raw Beef Products Using Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8 (9): 1019–1023. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0814>
- Frank, C., Faber, M.S., Askar, M., Bernard, H., Fruth, A., Gilsdorf, A., Hohle, M., Karch, H., Krause, G., Prager, R., Spode, A., Stark, K., Werber, D.,** 2011a. Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. *Euro Surveillance*. 26 (21): 1–3.

- 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., Muller, L., King, L.A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K., Krause, G., 2011b. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine*. 365 (19): 1771–1780. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106483>
- Fraser, M.E., Chernaia, M.M., Kozlov, Y. V., James, M.N., 1994. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nature Structural Biology*. 1 (1): 59–64.
- 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. *Journal of Infectious Diseases*. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (6): 2448–2453.
- Friesema, I., Van Der Zwaluw, K., Schuurman, T., Kooistra-Smid, M., Franz, E., Van Duynhoven, Y., Van Pelt, W., 2014. Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. *Eurosurveillance*. 19 (17): 26–32. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.17.20787>
- Gamage, S.D., Patton, A.K., Hanson, J.F., Weiss, A.A., 2004. Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage. *Infection and Immunity*. 72 (12): 7131–7139.
- Gamage, S.D., Strasser, J.E., Chalk, C.L., Weiss, A.A., 2003. Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin. *Infection and Immunity*. 71 (6): 3107–3115.
- 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. *Veterinary Microbiology*. 121 (3–4): 373–377. [https://doi.org/S0378-1135\(06\)00532-3](https://doi.org/S0378-1135(06)00532-3) [pii] 10.1016/j.vetmic.2006.12.012

Bibliografía

- Gerner-Smidt, P., Hise, K., Kincaid, J., Hunter, S., Rolando, S., Hyytiä-Trees, E., Ribot, E.M., Swaminathan, B.,** 2006. PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3 (1): 9–19.
- Goering, R. V.,** 2004. Pulsed-field gel electrophoresis, in: Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y.-W., Unger, E.R., Relman, D.A., White, T.J. (Eds.), *Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice*. ASM Press, Washington, DC, pp. 185–196.
- Gomariz, M., Robertson, M.T., Serrano, E., Iglesias, L., Pérez-Trallero, E.,** 2000. Estudio de dos brotes de *E. coli* O157:H7 en Guipúzcoa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 18 : 84.
- González, J., Sanso, A.M., Lucchesi, P.M.A., Bustamante, A. V.,** 2014. Comparison of 2 proposed MLVA protocols for subtyping non-O157: H7 verotoxigenic *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 78 (4): 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.017>
- Gordon, D.M., Cowling, A.,** 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*. 149 (Pt 12): 3575–3586.
- Grande, L., Michelacci, V., Bondi, R., Gigliucci, F., Franz, E., Askari Badouei, M., Schlager, S., Minelli, F., Tozzoli, R., Caprioli, A., Morabito, S.,** 2016. Whole-genome characterization and strain comparison of VT2f-producing *Escherichia coli* causing hemolytic uremic syndrome. *Emerging Infectious Diseases*. 22 (12): 2078–2086. <https://doi.org/10.3201/eid2212.160017>
- Gyles, C.L. (Ed.),** 1994. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford.
- Gyles, C.L.,** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*. 85 (13 Suppl): E45-62.
- Hacker, J., Carniel, E.,** 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep*. 2 (5): 376–381. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve097>

- Harris, S.M., Yue, W.-F., Olsen, S.A., Hu, J., Means, W.J., McCormick, R.J., Du, M., Zhu, M.-J.,** 2012. Salt at concentrations relevant to meat processing enhances Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. 159 (3): 186–192. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.007>
- Hartl, D.L., Dykhuizen, D.E.,** 1984. The population genetics of *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*. 18 : 31–68.
- Haugum, K., Brandal, L.T., Løbersli, I., Kapperud, G., Lindstedt, B.A.,** 2011. Detection of virulent *Escherichia coli* O157 strains using multiplex PCR and single base sequencing for SNP characterization. *Journal of Applied Microbiology*. 110 (6): 1592–1600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05015.x>
- Haugum, K., Brandal, L.T., Lindstedt, B.A., Wester, A.L., Bergh, K., Afset, J.E.,** 2014. PCR-based detection and molecular characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in a routine microbiology laboratory over 16 years. *Journal of Clinical Microbiology*. 52 (9): 3156–3163. <https://doi.org/10.1128/JCM.00453-14>
- Havelaar, A.H., Haagsma, J.A., Mangen, M.J., Kemmeren, J.M., Verhoef, L.P., Vijgen, S.M., Wilson, M., Friesema, I.H., Kortbeek, L.M., van Duynhoven, Y.T., van Pelt, W.,** 2012. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *International Journal of Food Microbiology*. 156 (3): 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.029>
- Hayashi, T., Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani,** 2008. Genomic view on the evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, in: Barquero, F., Nombela, C., Cassell, G.H., Gutiérrez, J.A. (Eds.), *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. ASM Press (American Society of Microbiology), Washington, D.C., pp. 407–419.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 45 (11): 3817–3820.

Bibliografía

- Helldal, L., Karami, N., Welinder-Olsson, C., Moore, E.R.B., Åhren, C.,** 2017. Evaluation of MLVA for epidemiological typing and outbreak detection of ESBL-producing *Escherichia coli* in Sweden. *BMC Microbiology*. 17 (8): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0922-1>
- Hernández, L.B., Cadona, J.S., Christensen, M., Fernández, D., Padola, N.L., Bustamante, A.V., Sanso, A.M.,** 2018. Virulence genes and genetic diversity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91 strains from cattle, beef and poultry products. *Microbial Pathogenesis*. 125 (August): 463–467. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.009>
- Herold, S., Karch, H., Schmidt, H.,** 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology*. 294 (2–3): 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.023>
- Hoey, D.E., Sharp, L., Currie, C., Lingwood, C.A., Gally, D.L., Smith, D.G.,** 2003. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cell Microbiology*. 5 (2): 85–97.
- Holmes, A., Perry, N., Willshaw, G., Hanson, M., Allison, L.,** 2015. Inter-laboratory comparison of multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 to facilitate data sharing. *Epidemiology and Infection*. <https://doi.org/10.1017/S0950268814000739>
- Hudault, S., Guignot, J., Servin, A.L.,** 2001. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*. 49 (1): 47–55.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A.,** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. 26 (11): 2465–2466.
- Hunter, P.R.,** 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 28 (9): 1903–1905.

- Hunter, S.B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M.A., Van Duynne, M.S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T., Ribot, E.,** 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (3): 1045–1050.
- 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 Pathogens and Disease*. 3 (1): 118–131.
- Hyytiä-Trees, E., Lafon, P., Vauterin, P., Ribot, E.M.,** 2010. Multilaboratory Validation Study of Standardized Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Protocol for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157: A Novel Approach to Normalize Fragment Size Data Between Capillary Electrophoresis Plat. *Foodborne Pathogens and Disease*. 7 (2): 129–136. <https://doi.org/10.1089=fpd.2009.0371>
- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., Muniesa, M.,** 2009. Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (6): 1764–1768. <https://doi.org/10.1128/AEM.02273-08>
- Imamovic, L., Tozzoli, R., Michelacci, V., Minelli, F., Marziano, M.L., Caprioli, A., Morabito, S.,** 2010. OI-57, a genomic island of *Escherichia coli* O157, is present in other seropathotypes of Shiga toxin-producing *E. coli* associated with severe human disease. *Infection and Immunity*. 78 (11): 4697–4704. <https://doi.org/10.1128/IAI.00512-10>
- Ingersoll, M.A., Moss, J.E., Weinrauch, Y., Fisher, P.E., Groisman, E.A., Zychlinsky, A.,** 2003. The ShiA protein encoded by the *Shigella flexneri* SHI-2 pathogenicity island attenuates inflammation. *Cellular Microbiology*. 5 (11): 797–807. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00320.x>

Bibliografía

- Izumiya, H., Terajima, J., Wada, A., Inagaki, Y., Itoh, K.I., Tamura, K., Watanabe, H., 1997.** Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 35 (7): 1675–1680.
- Izumiya, H., Pei, Y., Terajima, J., Ohnishi, M., Hayashi, T., Iyoda, S., Watanabe, H., 2010.** New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiology and Immunology*. 54 (10): 569–577. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00252.x>
- Jay, M.T., Cooley, M., Carychao, D., Wiscomb, G.W., Sweitzer, R.A., Crawford-Miksza, L., Farrar, J.A., Lau, D.K., O'Connell, J., Millington, A., Asmundson, R. V., Atwill, E.R., Mandrell, R.E., 2007.** *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (12): 1908–1911.
- Jenke, C., Harmsen, D., Weniger, T., Rothganger, J., Hyytia-Trees, E., Bielaszewska, M., Karch, H., Mellmann, A., 2010.** Phylogenetic analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Germany, 1987-2008. *Emerging Infectious Diseases*. 16 (4): 610–616. <https://doi.org/10.3201/eid1604.091361>
- Jenke, C., Lindstedt, B.A., Harmsen, D., Karch, H., Brandal, L.T., Mellmann, A., 2011.** Comparison of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and multilocus sequence typing for differentiation of hemolytic-uremic syndrome-associated *Escherichia coli* (HUSEC) collection strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 49 (10): 3644–3646. <https://doi.org/JCM.05035-11> [pii] 10.1128/JCM.05035-11
- Johnson, J.M., Weagant, S.D., Jinneman, K.C., Bryant, J.L., 1995.** Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Escherichia coli* O157:H7 during a food-borne outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (7): 2806–2808.
- Johnson, K.E., Thorpe, C.M., Sears, C.L., 2006.** The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*. 43 (12): 1587–1595.

- Jones, M., Octavia, S., Lammers, G., Heller, J., Lan, R.,** 2017. Population and evolutionary dynamics of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in a beef herd: A longitudinal study. *Environmental Microbiology*. 19 (5): 1836–1844. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13679>
- Kajiura, T., Tanaka, M., Wada, H., Ito, K., Koyama, Y., Kato, F.,** 2001. Effects of Disinfectants on Shiga-Like Toxin Converting Phage from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Health Science*. 47 (2): 203–207. <https://doi.org/10.1248/jhs.47.203>
- Kaper, J.B., Gansheroff, L.J., Wachtel, M.R., O'Brien, A.D.,** 1998. Intimin-mediated adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and attaching-and-effacing pathogens, in: Kaper, J.B., O'Brien, A.D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 148–156.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.,** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*. 2 (2): 123–140.
- Karama, M., Gyles, C.L.,** 2008. Characterization of Verotoxin-Encoding Phages from *Escherichia coli* O103:H2 Strains of Bovine and Human Origins. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (16): 5153–5158. <https://doi.org/10.1128/aem.00723-08>
- Karama, M., Gyles, C.L.,** 2010. Methods for Genotyping Verotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Zoonoses and Public Health*. 57 (7-8): 447–462. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01259.x>
- Karch, H., Denamur, E., Dobrindt, U., Finlay, B.B., Hengge, R., Johannes, L., Ron, E.Z., Tonjum, T., Sansonetti, P.J., Vicente, M.,** 2012. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Molecular Medicine*. 4 (9): 841–848. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201662>
- Karch, H., Tarr, P.I., Bielaszewska, M.,** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. 295 (6–7): 405–418.
- Karmali, M.A.,** 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2 (1): 15–38.

Bibliografía

- 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* EDL933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (11): 4930–4940.
- Kauffmann, F.,** 1947. The serology of the *coli* group. *Journal of Immunology*. 57 : 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. *Journal of Medical Microbiology*. 57 (Pt 1): 58–63.
- Keene, W.E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D.H., Hancock, D.D., Balan, V.K., Zhao, T., Doyle, M.P.,** 1997. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 277 (15): 1229–1231.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*. 98 (4): 928–940.
- Kimmitt, P.T., Harwood, C.R., Barer, M.R.,** 2000. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerging Infectious Diseases*. 6 (5): 458–465.
- Klapproth, J.M.A., Scaletsky, I.C.A., McNamara, B.P., Lai, L.C., Malstrom, C., James, S.P.,
Donnenberg, M.S.,** 2000. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infection and Immunity*. 68 (4): 2148–2155.
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.2148-2155.2000>
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., McNeish, A.S.,** 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 57 (4): 1290–1298.

- Kokai-Kun, J.F., Melton-Celsa, A.R., O'Brien, A.D.,** 2000. Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (5): 3713–3721.
- Kondo, S., Hoar, B.R., Villanueva, V., Mandrell, R.E., Atwill, E.R.,** 2010. Longitudinal prevalence and molecular typing of *Escherichia coli* O157:H7 by use of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in fecal samples collected from a range-based herd of beef cattle in Calif. *American Journal of Veterinary Research*. 71 (11): 1339–1347. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.11.1339>
- Konno, T., Yatsuyanagi, J., Saito, S.,** 2011. Application of a Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis to Regional Outbreak Surveillance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 64 : 63–65.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I., Stavric, S.,** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 18 (3): 775–779.
- Krüger, A., Lucchesi, P.M., Parma, A.E.,** 2011. Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing *Escherichia coli* isolates: type, number of variants, and relationship to cytotoxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (1): 73–79. <https://doi.org/10.1128/AEM.01445-10>
- Krüger, A., Lucchesi, P.M.,** 2015. Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology*. 161 (Pt 3): 451–462. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000003>
- 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.A.,** 2015. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated from animal, food, and clinical samples. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 5 (74): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00074>
- Kudva, I.T., Evans, P.S., Perna, N.T., Barrett, T.J., Ausubel, F.M., Blattner, F.R., Calderwood, S.B.,** 2002. Strains of *Escherichia coli* O157:H7 differ primarily by insertions or deletions, not single-nucleotide polymorphisms. *Journal of Bacteriology*. 184 (7): 1873–1879.

Bibliografía

- Kumar, A., Taneja, N., Kumar, Y., Sharma, M.,** 2012. Detection of Shiga toxin variants among Shiga toxin-forming *Escherichia coli* isolates from animal stool, meat and human stool samples in India. *Journal of Applied Microbiology*. 113 (5): 1208–1216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05415.x>
- Kumar, A., Taneja, N., Bharti, B., Sharma, M.,** 2014a. Characterization of shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhoea & haemolytic uremic syndrome in north india. *Indian Journal of Medical Research*. 140 (6): 778–784.
- Kumar, A., Taneja, N., Sharma, M.,** 2014b. An Epidemiological and Environmental Study of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in India. *Foodborne Pathogens and Disease*. 11 (6): 439–446. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1613>
- Kumar, A., Taneja, N., Sharma, R.K., Sharma, H., Ramamurthy, T., Sharma, M.,** 2014c. Molecular characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolated from diverse sources from India by multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA). *Epidemiology and Infection*. 142 (12): 2572–2582. <https://doi.org/10.1017/S0950268814000065>
- Lai, Y., Sun, F.,** 2003. The Relationship between Microsatellite Slippage Mutation Rate and the Number of Repeat Units. *Molecular Biology and Evolution*. 20 (1): 2123–2131. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg228>
- Law, D.,** 2000. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (5): 729–745.
- Levinson, G., Gutman, G.A.,** 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution*. 4 (3): 203–221. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040442>
- 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). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 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. *Journal of Microbiological Methods*. 58 (2): 213–222.
- Lindstedt, B.A.,** 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*. 26 (13): 2567–2582. <https://doi.org/10.1002/elps.200500096>
- 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. *Journal of Microbiological Methods*. 69 (1): 197–205.
- Lindstedt, B.A., Torpdahl, M., Vergnaud, G., Le Hello, S., Weill, F.X., Tietze, E., Malorny, B., Prendergast, D.M., Ní Ghallchóir, E., Lista, R.F., Schouls, L.M., Söderlund, R., Börjesson, S., Åkerström, S.,** 2013. Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight european countries, 2012. *Eurosurveillance*. <https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20385-en>
- Lior, H.,** 1994. Classification of *Escherichia coli*, in: Gyles, C.L. (Ed.), *Escherichia Coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford, pp. 31–72.
- Løbersli, I., Haugum, K., Lindstedt, B.A.,** 2012. Rapid and high resolution genotyping of all *Escherichia coli* serotypes using 10 genomic repeat-containing loci. *Journal of Microbiological Methods*. 88 (1): 134–139. [https://doi.org/S0167-7012\(11\)00391-5](https://doi.org/S0167-7012(11)00391-5) [pii] 10.1016/j.mimet.2011.11.003
- Lovett, S.T., Feschenko, V. V.,** 1996. Stabilization of diverged tandem repeats by mismatch repair: evidence for deletion formation via a misaligned replication intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (14): 7120–7124.

Bibliografía

- Lukinmaa, S., Nakari, U.M., Eklund, M., Siitonen, A.,** 2004. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology. APMIS.* 112 (11–12): 908–929. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1213.x>
- Mainil, J.G., Daube, G.,** 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology.* 98 (6): 1332–1344.
- Manges, A.R., Tellis, P.A., Vincent, C., Lifeso, K., Geneau, G., Reid-Smith, R.J., Boerlin, P.,** 2009. Multi-locus variable number tandem repeat analysis for *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Journal of Microbiological Methods.* 79 (2): 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.006>
- Mariani-Kurkdjian, P., Lemâitre, C., Bidet, P., Perez, D., Boggini, L., Kwon, T., Bonacorsi, S.,** 2014. Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype. *New Microbes and New Infections.* 2 (4): 127–31. <https://doi.org/10.1002/nmi2.49>
- Marques, L.R.M., Peiris, J.S.M., Cryz, S.J., O'Brien, A.D.,** 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiology Letters.* 44 : 33–38.
- Martínez, R., García, A., Blanco, J.E., Blanco, J., Rey, J., Alonso, J.M., Gómez, L., Sánchez, S.,** 2011. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in the faeces of free-ranging wild lagomorphs in southwest Spain. *European Journal of Wildlife Research.* 57 (1): 187–189. <https://doi.org/10.1007/s10344-010-0431-8>
- Martínez, R., Sánchez, S., Rey, J., Alonso, J.M.,** 2010. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from patients in Cáceres, Extremadura (Spain) (2006–2007). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 28 : 136–137. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.04.006>
- Mathusa, E.C., Chen, Y., Enache, E., Hontz, L.,** 2010. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Journal of Food Protection.* 73 (9): 1721–1736.

- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B.,** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 92 (5): 1664–1668.
- McDaniel, T.K., Kaper, J.B.,** 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Molecular Microbiology.* 23 (2): 399–407.
- McDonald, J.E., Smith, D.L., Fogg, P.C., McCarthy, A.J., Allison, H.E.,** 2010. High-throughput method for rapid induction of prophages from lysogens and its application in the study of Shiga Toxin-encoding *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology.* 76 (7): 2360–2365. <https://doi.org/10.1128/AEM.02923-09>
- McElhiney, J., Hawkins, G., Allison, L., Bruce, R., Horne, J., Hanson, M., Smith-Palmer, A., Browning, L.,** 2018. Outbreak of *Escherichia coli* O157 Phage Type 32 linked to the consumption of venison products. *Epidemiology and Infection.* 146 : 1922–1927. <https://doi.org/10.1017/s0950268818001784>
- Mellor, G.E., Besser, T.E., Davis, M.A., Beavis, B., Jung, W., Smith, H. V., Jennison, A. V., Doyle, C.J., Chandry, P.S., Gobius, K.S., Fegand, N.,** 2013. Multilocus genotype analysis of *Escherichia coli* O157 Isolates from Australia and the United States provides evidence of geographic divergence. *Applied and Environmental Microbiology.* 79 (16): 5050–5058. <https://doi.org/10.1128/AEM.01525-13>
- Melton-Celsa, A.R.,** 2014. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology Spectrum.* 2 (2): 1–21. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013>
- 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. *Clinical Microbiology and Infection.* 19 (3): E149–E156. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12122>

Bibliografía

- 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 Microbiology Letters*. 303 (2): 137–146. <https://doi.org/FML1874> [pii] 10.1111/j.1574-6968.2009.01874.x
- Milkman, R.,** 1999. Gene Transfer in *Escherichia coli*, in: *Organization of the Prokaryotic Genome*. American Society of Microbiology. <https://doi.org/doi:10.1128/9781555818180.ch16>
- Montero, D.A., Velasco, J., Del Canto, F., Puente, J.L., Padola, N.L., Rasko, D.A., Farfán, M., Salazar, J.C., Vidal, R.,** 2017. Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Scientific Reports*. 7 (1): 7011. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06999-y>.
- Mora, A., Blanco, M., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Dahbi, 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). *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (9): 4007–4015.
- 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.,** 2007. 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 Microbiology*. 7 : 13.
- Mora, A., Herrera, A., Lopez, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J.M., Alonso, M.P., Llovo, J., Bernardez, 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. *International Microbiology*. 14 (3): 121–141.

- Morabito, S., Tozzoli, R., Oswald, E., Caprioli, A.,** 2003. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infection and Immunity*. 71 (6): 3343–3348.
- Moxley, R.A.,** 2000. Edema disease. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 16 (1): 175–185.
- Muniesa, M., Lucena, F., Jofre, J.,** 1999. Comparative survival of free shiga toxin 2-encoding phages and *Escherichia coli* strains outside the gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (12): 5615–5618.
- Muniesa, M., de Simon, M., Prats, G., Ferrer, D., Panella, 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. *Infection and Immunity*. 71 (8): 4554–4562.
- Muniesa, M., Blanco, J.E., de Simón, M., Serra-Moreno, R., Blanch, A.R., Jofre, J.,** 2004a. Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology*. 150 (9): 2959–2971.
<https://doi.org/doi:10.1099/mic.0.27188-0>
- Muniesa, M., Serra-Moreno, R., Jofre, J.,** 2004b. Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* genes appeared conserved. *Environmental Microbiology*. 6 (7): 716–725.
- 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 Veterinary Research*. 4 : 2.

Bibliografía

- Nakajima, H., Kiyokawa, N., Katagiri, Y.U., Taguchi, T., Suzuki, T., Sekino, T., Mimori, K., Ebata, T., Saito, M., Nakao, H., Takeda, T., Fujimoto, J., 2001.** Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (46): 42915–42922. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106015200>
- Nakamura, Y., Leppert, M., O`Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., Et, A., 1987.** Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*. 235 (4796): 1616–1622. <https://doi.org/10.1126/science.3029872>
- Nakamura, H., Iguchi, A., Maehara, T., Fujiwara, K., Fujiwara, A., Ogasawara, J., 2018.** Comparison of three molecular subtyping methods among O157 and non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from Japanese Cattle. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 71 (1): 45–50. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2017.297>
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (1): 142–201.
- Neisser, M., Shiga, K., 1903.** Ueber freie Receptoren von Typhusund Dysenteriebazillen und über das Dysenterietoxin. *Deutsche Medizinische Wochschrif*. 29 : 61–62.
- 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. *Emerging Infectious Diseases*. 15 (3): 372–380. <https://doi.org/10.3201/eid1502.080631>
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 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 Pathogens and Disease*. 3 (1): 81–87.

- Noller, A.C., McEllistrem, M.C., Pacheco, A.G.F., Boxrud, D.J., Harrison, L.H.,** 2003. Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Distinguishes Outbreak and Sporadic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (12): 5389–5397.
- Noller, A.C., McEllistrem, M.C., Shutt, K.A., Harrison, L.H.,** 2006. Locus-specific mutational events in a multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (2): 374–377.
- O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Thompson, M.R., Formal, S.B.,** 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*. 146 (6): 763–769.
- Oot, R.A., Raya, R.R., Callaway, T.R., Edrington, T.S., Kutter, E.M., Brabban, A.D.,** 2007. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7-infecting bacteriophages in feedlot cattle feces. *Letters in Applied Microbiology*. 45 (4): 445–453. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02211.x>
- 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. *Epidemiology and Infection*. 130 (2): 313–321.
- Paton, J.C., Paton, A.W.,** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (3): 450–479.
- Pebody, R.G., Furtado, C., Rojas, A., McCarthy, N., Nysten, 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 amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiology and Infection*. 123 (2): 217–223.

Bibliografía

- 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. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 61 (1): 58–64.
- Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, 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. *Infection and Immunity*. 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. *Journal of Applied Microbiology*. 115 (4): 1052–1058.
<https://doi.org/10.1111/jam.12303>
- Persad, A.K., LeJeune, J.T.,** 2014. Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*. 2 (4): 14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014>
- Picozzi, C., Volponi, G., Vigentini, I., Grassi, S., Foschino, R.,** 2012. Assessment of transduction of Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Stx2-encoding phage in dairy process conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 153 (3): 388–394.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.031>
- Pitout, J.D.D.,** 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*. 3 (9): 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>
- Pohl, P.,** 1993. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 137 : 325–333.

- Poulsen, L.K., Lan, F., Kristensen, C.S., Hobolth, P., Molin, S., Kroghfelt, K.A.,** 1994. Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infection and Immunity*. 62 (11): 5191–5194.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (6): 2460–2468.
- 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. *International Journal of Medical Microbiology*. 301 (3): 181–189.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.06.003>
- Prendergast, D.M., Lendrum, L., Pearce, R., Ball, C., McLernon, J., O’Grady, D., Scott, L., Fanning, S., Egan, J., Gutierrez, M.,** 2011. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in beef and sheep abattoirs in Ireland and characterisation of isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 144 (3): 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.012>
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S.A., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebahia, M., Thomson, N.R., Chaudhuri, R., Henderson, I.R., Sperandio, V., 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.
<https://doi.org/10.1128/JB.00619-08>
- Rastegar Lari, A., Gold, F., Borderon, J.C., Laugier, J., Lafont, J.P.,** 1990. Implantation and *in vivo* antagonistic effects of antibiotic-susceptible *Escherichia coli* strains administered to premature newborns. *Biology of the Neonate*. 58 (2): 73–78.

Bibliografía

- 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. *Journal of Wildlife Diseases.* 37 (4): 755–760.
- 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.I., Blanco, J., 2003.** Serotypes, phage types and virulence genes of shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Veterinary Microbiology.* 94 (1): 47–56.
- Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J.E., Hermoso De Mendoza, J., Hermoso De Mendoza, M., García, 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. *International Journal of Food Microbiology.* 107 (2): 212–217.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.025>
- Reyes-Rodríguez, N.E., Soriano-Vargas, E., Barba-León, J., Navarro, A., Talavera-Rojas, M., Sanso, A.M., Bustamante, A. V., 2015.** Genetic Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Cattle Carcasses and Feces in Mexico State. *Journal of Food Protection.* 78 (4): 796–801.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-425>
- 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. *New England Journal of Medicine.* 308 (12): 681–685.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldan, C.D., Balbi, L., García, B., Fiorilli, G., Sosa-Estani, S., Kincaid, J., Rangel, J., Griffin, P.M., 2006.** Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease.* 3 (1): 88–96.
- Rode, T.M., Axelsson, L., Granum, P.E., Heir, E., Holck, A., L’Abee-Lund, T.M., 2011.** High stability of Stx2 phage in food and under food-processing conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* 77 (15): 5336–5341. <https://doi.org/10.1128/AEM.00180-11>

- Rooks, D.J., Libberton, B., Woodward, M.J., Allison, H.E., McCarthy, A.J.,** 2012. Development and application of a method for the purification of free shigatoxigenic bacteriophage from environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*. 91 (2): 240–245.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.017>
- 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. *Emerging Infectious Diseases*. 18 (2): 279–282.
<https://doi.org/10.3201/eid1802.110855>
- Rowell, S., King, C., Jenkins, C., Dallman, T.J., Decraene, V., Lamden, K., Howard, A., Featherstone, C.A., Clearly, P.,** 2016. An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O157 linked to a lamb-feeding event. *Epidemiology and Infection*. 144 (12): 2494–2500.
<https://doi.org/10.1017/s0950268816001229>
- Rumore, J.L., Tschetter, L., Nadon, C.,** 2016. The Impact of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis on PulseNet Canada *Escherichia coli* O157:H7 Laboratory Surveillance and Outbreak Support, 2008–2012. *Foodborne Pathogens and Disease*. 13 (5): 255–261.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2066>
- Sakai, T., Ohmae, H., Kitahori, Y.,** 2010a. New modified method of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 63 (10): 217–219.
- Sakai, T., Tanabe, S., Hashida, M., Ohmae, H., Kitahori, Y.,** 2010b. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in outbreak of food poisoning caused by formed beef chunk steaks. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 63 (2): 152–153.

Bibliografía

- Sales, J., Vali, L., Hoyle, D. V., Yates, C.M., Amyes, S.G.B., McKendrick, I.J.,** 2007. The interaction between dam methylation sites and *Xba*I restriction digest sites in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Journal of Applied Microbiology*. 102 (3): 820–825. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03115.x>
- Samuel, J.E., Perera, L.P., Ward, S., O'Brien, A.D., Ginsburg, V., Krivan, H.C.,** 1990. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infection and Immunity*. 58 (3): 611–618.
- Sánchez, S.,** 2008. Epidemiología de los *Escherichia coli* verotoxigénicos de origen ovino: estudio longitudinal y de relaciones clonales en explotaciones ovinas extremeñas mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE). Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Extremadura, Cáceres.
- 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. *Veterinary Journal*. 180 (3): 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.01.011>
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (6): 1769–1773. <https://doi.org/10.1128/AEM.02043-08>
- Sánchez, S., Martínez, R., Alonso, J.M., Rey, J.,** 2010a. Clinical and pathogenic aspects of infections due to *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxigenic *E. coli*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 28 (6): 370–374. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.009>

- Sánchez, S., Martínez, R., García-Sánchez, A., Rey, J., Alonso, A., Vidal, D., Echeita, A., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Herrera-León, García, A., Vidal, D., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Herrera-León, S., Echeita, A., Alonso, J.M., Rey, J., 2010b.** Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Veterinary Microbiology*. 143 (2–4): 420–423. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.016>
- Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Benítez, J.M., Blanco, J., Blanco, J.E., Blanco, M., Dahbi, G., López, C., Mora, A., Alonso, J.M., Rey, J., 2010c.** Variation in the prevalence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in four sheep flocks during a 12-month longitudinal study. *Small Ruminant Research*. 93 (2–3): 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.05.014>
- Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Blanco, J., Echeita, A., Hermoso de Mendoza, J., Rey, J., Alonso, J.M., 2010d.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from extensive cattle of the fighting bulls breed. *Research in Veterinary Science*. 88 (2): 208–210. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.07.014>
- 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., 2010e.** Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. *Veterinary Microbiology*. 142 (3–4): 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.009>
- 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. *Veterinary Microbiology*. 159 (3–4): 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.036>

Bibliografía

- Sánchez, S., Cenoz, M.G., Martín, C., Beristain, X., Llorente, M.T., Herrera-León, S.,** 2014a. Cluster investigation of mixed O76:H19 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* infection in a Spanish household. *Epidemiology and Infection*. 142 (5): 1029–1033. <https://doi.org/10.1017/S0950268813001842>
- Sánchez, S., Herrera-León, L., Llorente-Rodríguez, M.T., Herrera-León, S.,** 2014b. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in Spain: Did the German outbreak mark a before and after? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 32 (02): 133–135.
- Sánchez, S., Llorente, M.T., Herrera-León, L., Ramiro, R., Nebreda, S., Remacha, M.A., Herrera-León, S.,** 2017. Mucus-activatable shiga toxin genotype stx2d in *Escherichia coli* O157:H7. *Emerging Infectious Diseases*. 23 (8): 1431–1433. <https://doi.org/10.3201/eid2308.170570>
- Sánchez, S., Llorente, M.T., Ramiro, R., Herrera-León, L., Herrera-León, S.,** 2019. Evaluation of the SHIGA TOXIN QUIK CHEK after overnight enrichment as screening tool for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* detection in human fecal samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 94 (3): 218–222. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.010>
- Sánchez, S., Aladueña, A.M., Herrera-León, S.,** n.p. Datos no publicados del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III).
- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J. V, Hansen, S.H., van Deurs, B.,** 1992. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature*. 358 (6386): 510–512.
- Sanso, A.M., Bustamante, A. V., Krüger, A., Cadona, J.S., Alfaro, R., Cáceres, M.E., Fernández, D., Lucchesi, P.M.A., Padola, N.L.,** 2018. Molecular epidemiology of Shiga toxin-producing O113:H21 isolates from cattle and meat. *Zoonoses and Public Health*. 65 (5): 569–577. <https://doi.org/10.1111/zph.12467>

- Sauvala, M., Laaksonen, S., Laukkanen-Ninios, R., Jalava, K., Stephan, R., Fredriksson-Ahomaa, M.,** 2019. Microbial contamination of moose (*Alces alces*) and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) carcasses harvested by hunters. *Food Microbiology*. 78: 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.011>
- Schamberger, G.P., Phillips, R.L., Jacobs, J.L., Diez-Gonzalez, F.,** 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (10): 6053–6060. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6053-6060.2004>
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A.D.,** 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 50 (9): 2951–2963. <https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>
- 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 Infectious Diseases*. 8 : 41.
- Schmidt, H., Bitzan, M., Karch, H.,** 2001. Pathogenic aspects of Shiga toxin-producing *E. coli* infections in humans, in: Duffy, G., Garvey, P., McDowell, D.A. (Eds.), *Verocytotoxigenic E. Coli*. Food and Nutrition Press Inc., Trumbull, pp. 241–262.
- Schmidt, H., Hensel, M.,** 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 17 (1): 14–56.
- Schüller, S.,** 2011. Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins (Basel)*. 3 (6): 626–639. <https://doi.org/10.3390/toxins3060626>

Bibliografía

- Sekse, C., Sunde, M., Lindstedt, B.A., Hopp, P., Bruheim, T., Cudjoe, K.S., Kvitle, B., Urdahl, A.M.,** 2011. Potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O26 in Norwegian sheep flocks. Applied and Environmental Microbiology. 77 (14): 4949–4958. <https://doi.org/AEM.00189-11> [pii] 10.1128/AEM.00189-11
- Sharapov, U.M., Wendel, A.M., Davis, J.P., Keene, W.E., Farrar, J., Sodha, S., Hyytia-Trees, E., Leeper, M., Gerner-Smidt, P., Griffin, P.M., Braden, C.,** 2016. Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach: United States, 2006. Journal of Food Protection. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-556>
- Shima, K., Terajima, J., Sato, T., Nishimura, K., Tamura, K., Watanabe, H., Takeda, Y., Yamasaki, S.,** 2004. Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for the epidemiological analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology. 42 (11): 5205–5213.
- 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. Annals of Internal Medicine. 126 (7): 505–513.
- Smith, D.L., Rooks, D.J., Fogg, P.C., Darby, A.C., Thomson, N.R., McCarthy, A.J., Allison, H.E.,** 2012. Comparative genomics of Shiga toxin encoding bacteriophages. BMC Genomics. 13 : 311. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-311>
- Smith, H.R., Rowe, B., Gross, R.J., Fry, N.K., Scotland, S.M.,** 1987. Haemorrhagic colitis and Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in England and Wales. Lancet. 1 (8541): 1062–1065.
- Söderlund, R., Jernberg, C., Ivarsson, S., Hedenström, I., Eriksson, E., Bongcam-Rudloff, E., Aspán, A.,** 2014. Molecular typing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from Swedish cattle and human cases: Population dynamics and virulence. Journal of Clinical Microbiology. 52 (11): 3906–3912. <https://doi.org/10.1128/JCM.01877-14>

- Staples, M., Graham, R.M.A., Doyle, C.J., Smith, H. V., Jennison, A. V.,** 2012. Prolonged and mixed non-O157 *Escherichia coli* infection in an Australian household. *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (5): E140-143. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03790.x>
- Stevens, M.P., Roe, A.J., Vlisidou, I., Van Diemen, P.M., La Ragione, R.M., Best, A., Woodward, M.J., Gally, D.L., Wallis, T.S.,** 2004. Mutation of *tox B* and a truncated version of the *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infection and Immunity*. 72 (9): 5402–5411. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5402-5411.2004>
- 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*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2 : 133. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00133>
- Streulens, M.J., DeRyck, R., Deplano, A.,** 2001. Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) typing, in: Dijkshoorn, L., Towner, K.J., Strulens, M. (Eds.), *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 159–176.
- Sussman, M.,** 1985. Theodor Escherich (1857-1911): A bibliographical note, in: Sussman, M. (Ed.), *Special Publications of the Society for General Microbiology, 13, The Virulence of Escherichia Coli, Reviews and Methods*. Academic Press, London, pp. 1–4.
- Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R. V,** 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 7 (3): 382–389.

- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., Ng, L.K., Lukinmaa, S., Kam, K.M., Rolando, S., Gutierrez, E.P., Binsztein, N.,** 2006. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3 (1): 36–50.
- Swirski, A.L., Pearl, D.L., Williams, M.L., Homan, H.J., Linz, G.M., Cernicchiaro, N., Lejeune, J.T.,** 2014. Spatial Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 in Dairy Cattle in Relation to Night Roosts Of *Sturnus vulgaris* (European Starling) in Ohio, USA (2007-2009). *Zoonoses and Public Health*. 61 (6): 427–435. <https://doi.org/10.1111/zph.12092>
- Tarr, P.I., Gordon, C.A., Chandler, W.L.,** 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 365 (9464): 1073–1086.
- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., Taguchi, H., Kamiya, S., Hayashi, T., Sasakawa, C.,** 2001. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infection and Immunity*. 69 (11): 6660–6669. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6660-6669.2001>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E.,** 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 8 (3): 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 33 (9): 2233–2239.
- 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 Pathogens and Disease*. 3 (1): 68–73.

- Timmons, C., Trees, E., Ribot, E.M., Gerner-Smidt, P., LaFon, P., Im, S., Ma, L.M.,** 2016. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain discrimination of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.04.005>
- Tozzoli, R., Caprioli, A., Morabito, S.,** 2005. Detection of *toxB*, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (8): 4052–4056. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4052-4056.2005>
- Tozzoli, R., Grande, L., Michelacci, V., Fioravanti, R., Gally, D., Xu, X., La Ragione, R., Anjum, M., Wu, G., Caprioli, A., Morabito, S.,** 2014. Identification and characterization of a peculiar vtx2-converting phage frequently present in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from human infections. *Infection and Immunity*. 82 (7): 3023–3032. <https://doi.org/10.1128/IAI.01836-14>
- 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. *Canadian Journal of Public Health*. 103 (5): 322–326. <https://doi.org/10.2307/canajpublhealth.103.5.e322>
- Urdahl, A.M., Strachan, N.J.C., Wasteson, Y., MacRae, M., Ogden, I.D.,** 2008. Diversity of *Escherichia coli* O157 in a longitudinal farm study using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Applied Microbiology*. 105 (5): 1344–1353.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., Verbrugh, H.,** 1998. Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (2): 275–293.
- van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-smidt, P., Brisse, S., Struelens, M.,** 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 13 (SUPPL. 3): 1–46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>

Bibliografía

- Vareille, M., de Sablet, T., Hindré, T., Martin, C., Gobert, A.P.,** 2007. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 104 (24): 10199–10204. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702589104>
- Viguera, E., Canceill, D., Ehrlich, S.D.,** 2001a. *In vitro* replication slippage by DNA polymerases from thermophilic organisms. Journal of Molecular Biology. 312 (2): 323–333. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4943> S0022-2836(01)94943-5 [pii]
- Viguera, E., Canceill, D., Ehrlich, S.D.,** 2001b. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. EMBO Journal. 20 (10): 2587–2595. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2587>
- Visvalingam, J., Wang, H., Youssef, M.K., Devos, J., Gill, C.O., Yang, X.Q.,** 2016. Spatial and Temporal Distribution of *Escherichia coli* on Beef Trimmings Obtained from a Beef Packing Plant. Journal of Food Protection. 79 (8): 1325–1331. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-598>
- Vogeleer, P., Tremblay, Y.D.N., Mafu, A.A., Jacques, M., Harel, J.,** 2014. Life on the outside: Role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Frontiers in Microbiology. 5 : 317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00317>
- Vogler, A.J., Keys, C., Nemoto, Y., Colman, R.E., Jay, Z., Keim, P.,** 2006. Effect of Repeat Copy Number on Variable-Number Tandem Repeat Mutations in *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Bacteriology. 188 (12): 4253–4263. <https://doi.org/10.1128/jb.00001-06>
- Vollaard, E.J., Clasener, H.A.,** 1994. Colonization resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 38 (3): 409–414.
- Wagner, P.L., Neely, M.N., Zhang, X., Acheson, D.W., Waldor, M.K., Friedman, D.I.,** 2001. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. Journal of Bacteriology. 183 (6): 2081–2085.
- Wahl, E., Vold, L., Lindstedt, B.A., Bruheim, T., Afset, J.E.,** 2011. Investigation of an *Escherichia coli* O145 outbreak in a child day-care centre - extensive sampling and characterization of *eae*-

- and *stx1*-positive *E. coli* yields epidemiological and socioeconomic insight. BMC Infectious Diseases. 11 (238): 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-238>
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y.,** 2017. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. International Journal of Food Microbiology. 249 : 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.003>
- Wang, R., Bono, J.L., Kalchayanand, N., Shackelford, S., Harhay, D.M.,** 2012. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. Journal of Food Protection. 75 (8): 1418–1428. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-427>
- Watahiki, M., Isobe, J., Kimata, K., Shima, T., Kanatani, J.I., 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. Journal of Clinical Microbiology. 52 (8): 2757–2763. <https://doi.org/10.1128/JCM.00420-14>
- Whittam, T.S.,** 1996. Genetic variation and evolutionary processes in natural populations of *Escherichia coli*, in: Neidhardt, F.C. (Ed.), *Escherichia Coli* and *Salmonella*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 2708–2720.
- Widgren, S., Söderlund, R., Eriksson, E., Fasth, C., Aspan, A., Emanuelson, U., Alenius, S., Lindberg, A.,** 2015. Longitudinal observational study over 38 months of verotoxigenic *Escherichia coli* O157: H7 status in 126 cattle herds. Preventive Veterinary Medicine. 121 (3–4): 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.010>
- Williams, M.L., Pearl, D.L., Lejeune, J.T.,** 2011. Multiple-locus variable-nucleotide tandem repeat subtype analysis implicates European starlings as biological vectors for *Escherichia coli* O157:H7 in Ohio, USA. Journal of Applied Microbiology. 111 (4): 982–988. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05102.x>

Bibliografía

- Williams, M.L., Pearl, D.L., Bishop, K.E., LeJeune, J.T.,** 2013. Use of Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis to Evaluate *Escherichia coli* O157 Subtype Distribution and Transmission Dynamics Following Natural Exposure on a Closed Beef Feedlot Facility. *Foodborne Pathogens and Disease*. 10 (10): 827–834. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1484>
- Willshaw, G.A., Cheasty, T., Frost, J.A., Threlfall, E.J., Rowe, B.,** 1996. Antimicrobial resistance of O157 VTEC in England and Wales. *EVC news 5. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità*. 9 (11(Suppl 3)): 3–4.
- Yue, W.-F., Du, M., Zhu, M.-J.,** 2012. High Temperature in Combination with UV Irradiation Enhances Horizontal Transfer of *stx2* Gene from *E. coli* O157:H7 to Non-Pathogenic *E. coli*. *PLoS ONE*. 7 (2): e31308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031308>
- Yun, L., Gu, Y., Zha, L., Zhu, F., Hou, Y.,** 2011. Utility of multilocus variable number tandem repeat analysis as a microbial forensic tool for subtyping Chinese *Escherichia coli* O157: H7 strains. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 3 (1): e293–e294. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.09.009>
- Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T., Karch, H.,** 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (4): 1441–1446.
- Zhang, W.L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., Schmidt, H.,** 2002. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (12): 4486–4492.
- Zhang, X., McDaniel, A.D., Wolf, L.E., Keusch, G.T., Waldor, M.K., Acheson, D.W.,** 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*. 181 (2): 664–670.

