



DIVERSIDAD GENÉTICA EN CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA AISLADAS A PARTIR DE CARNE MOLIDA DE ORIGEN BOVINO

GENETIC DIVERSITY IN SHIGA TOXIN-PRODUCING *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM GROUND MEAT OF BOVINE ORIGIN

¹Aperador Felipe, ORCID:0000-0002-5606-704x, ^{1*}Herrera Fanny - ORCID: 0000-0001-7090-6623, ²Santos Jesús ORCID:0000-0003-4001-3386

¹Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Microbiología. Correo electrónico: fannyh@unipamplona.edu.co. Km 1 Vía Bucaramanga, EL Buque, Pamplona, Colombia
² Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. España

Recibido: octubre 05 de 2022; Aceptado: diciembre de 2022

RESUMEN

El principal reservorio del patotipo de *Escherichia coli* Productor de Toxina Shiga es el ganado bovino, convirtiendo a la carne en un importante vehículo de su transmisión al hombre. Con el fin de realizar la caracterización de cepas de *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga aisladas a partir de muestras de este alimento, se efectuó la clasificación filogenética de las cepas, obteniendo que pertenecían al grupo E; mediante la técnica REP-PCR se detectó un patrón clonal heterogéneo; la técnica de MLST, por su parte, identificó nuevas Secuencias Tipo para cada cepa analizada. No se encontró asociación entre las características de las muestras de carne y las cepas analizadas.

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia Fanny Herrera E-mail: fannyh@unipamplona.edu.co

Palabras clave: Carne, MLST, REP-PCR, STEC, Toxina Shiga

ABSTRACT

The main reservoir of the Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* pathotype is cattle, making meat an important vehicle for its transmission to man. In order to characterize the Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* strains isolated from samples of this food, the phylogenetic classification of the strains was carried out, obtaining that they belonged to group E; Using the REP-PCR technique, a heterogeneous clonal pattern was detected; the MLST technique, on the other hand, identified new Type Sequences for each analyzed strain. No association was found between the characteristics of the meat samples and the strains analyzed.

Key words: Meat, MLST, REP-PCR, Shiga Toxin

INTRODUCCIÓN

La carne fresca de origen bovino tiene un a_w de 0,99 y compuestos de bajo peso molecular (como carbohidratos y aminoácidos) que favorecen el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (ICMSF, 2005); la Resolución 0719 de 2015 del Ministerio de Salud, clasifica a la carne en la categoría de riesgo alto para la salud pública (Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, 2015).

El consumo de este alimento sin la apropiadas medidas higiénico-sanitarias, aumentan la posibilidad de que sean

vehículo de bacterias patógenas para el hombre.

El principal reservorio de *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga (STEC) es el ganado bovino. El factor de virulencia más relevante de este patotipo bacteriano es la toxina Shiga que está codificada por los genes *stx1* y *stx2*, cada uno con sus respectivos subgrupos; esta toxina tiene la capacidad de diseminarse a partir del colon llegando a los riñones, pudiendo evolucionar el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) caracterizado por caracterizado por anemia

hemolítica, trombocitopenia y fallo renal agudo (Bouzari *et al.*, 2012). Adicionalmente, algunas cepas STEC poseen en su genoma la isla de patogenicidad (LEE) que codifica, principalmente, para una adhesina denominada intimina (*eaeA*) y su receptor Tir que son los responsables del proceso de fijación y borrado de los enterocitos, siendo una causa importante de diarrea no sanguinolenta, colitis hemorrágica (CH) y púrpura trombocitopénica (Nazaret, 2009). Por otra parte, se encuentra la enterohemolisina, proteína citolítica codificada por el gen *hly A*, que forman poros en los eritrocitos, liberando al grupo hemo favoreciendo el crecimiento del patógeno (Gyles, 2007).

Las cepas de STEC se pueden diferenciar serológicamente por la presencia de antígenos O (somáticos) y H (flagelares) por medio de los cuales se definen los serogrupos (sólo el antígeno O) o serotipos (antígeno O y antígeno H). El serotipo O157:H7 y los serotipos no O157: O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19 y O145:H28, son los más frecuentemente asociados con enfermedades en el ser humano (Rojas-López *et al.*, 2018).

Según la Organización Mundial de la Salud, STEC ocasionó más de un millón de casos y 128 muertes en el 2010 (WHO, 2018). El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) reportó en el 2019 a STEC como el tercer agente bacteriano productor de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETAs) con 3.127 casos confirmados y diez muertes (Tack *et al.*, 2020); de igual forma, en la Unión Europea STEC fue el tercer agente productor de infecciones en humanos con 8.161 casos confirmados, teniendo un incremento del 39,0% comparado con el 2017; de acuerdo con la proporción notificada, la categoría de alimentos más contaminada fue la de origen animal (ECDC, 2019).

En Colombia, no es obligatorio el reporte de STEC; sin embargo, se cuenta con datos de su prevalencia aportados por algunos estudios; Rúgeles *et al.*, (2010), reportaron 7,1% de STEC no O157 a partir alimentos de origen animal y vegetal. Martínez *et al.*, (2007), detectaron cepas STEC no O157 en el 6,06% de 132 cepas aisladas de muestras de carne. Herrera *et al.*, (2019), detectaron cepas STEC no O157 en el 39% de muestras de carne. Estos datos sugieren al aumentada

prevalencia de cepas STEC no O157 en alimentos en Colombia.

Existen varias técnicas para realizar la caracterización genética de cepas STEC. La Rep-PCR es un método de análisis genotípico que permite diferenciar microorganismos empleando cebadores complementarios a las secuencias consenso repetitivas intercaladas presentes en sus genomas. Estas secuencias no codificantes están presentes en múltiples copias en los genomas de la mayoría de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas por ejemplo las secuencias repetitivas palíndromas extragénicas repetitivas (REP); el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias (Mohapatra *et al.*, 2008).

La Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) se basa en la secuenciación de siete a ocho genes conservados o de mantenimiento (housekeeping) que son de

suma importancia para el mantenimiento básico de la función celular bacteriana. Estos genes suministran relaciones genéticas entre cepas bacterianas. Para cada uno de estos genes, las secuencias diferentes se corresponden con diferentes números de alelos. Así, los números de alelos obtenidos a partir de los 7-8 genes dan lugar a lo que se conoce como perfil de alelos o sequence type (ST) (Pérez-Losada *et al.*, 2017).

En el presente estudio se realizó la adscripción filogenética de cepas STEC aisladas de muestras de carne de origen bovino en Pamplona (Colombia) así como la caracterización genética mediante REP-PCR y MLST.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas.

Se analizaron 13 cepas STEC no O157 aisladas a partir de 100 muestras obtenidas

de carne cruda de bovino de la ciudad de Pamplona, Colombia (Herrera *et al.*, 2019).

Se mantuvieron conservadas en glicerol a temperatura de congelación siendo

reactivadas empleando caldo Tripticasa de Soja (TSB) a 37°C/24 h y posteriormente en TSA a la mismas condiciones de incubación. La tabla 1, destaca los perfiles de virulencia

de cada una de las cepas analizadas con las características de las muestras respectivas.

Tabla 1. Muestras y perfiles de virulencia de las cepas STEC analizadas

CEPA	GEN				DESCRIPCION		
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hly</i> A	DESCRIPCION	PIEZA	REFRIGERACION
15	POS	POS	NEG	POS	Molida	Pecho	SI
16	POS	POS	NEG	POS	Molida	Morillo	SI
20	POS	POS	NEG	POS	Molida	Lomo	NO
37	POS	POS	NEG	POS	Molida	Pecho	SI
74	NEG	POS	NEG	POS	Molida	Morillo	SI
80	POS	POS	NEG	POS	Molida	Morillo	NO
82	POS	POS	NEG	POS	Molida	Morillo	SI
84	NEG	POS	NEG	NEG	Molida	Morillo	SI
86	NEG	POS	NEG	POS	Molida	Morillo	SI
87	POS	POS	NEG	POS	Molida	Morillo	SI
94	POS	POS	NEG	POS	Molida	Morillo	SI
97	NEG	POS	NEG	POS	Molida	Morillo	SI
98	NEG	POS	NEG	NEG	Molida	Morillo	SI

Identificación del grupo filogenético

Con el fin de agrupar a las cepas en alguno de los grupos filogenéticos según la clasificación de Clermont para *E. coli* (A, B1, B2 y D o E), se realizó una PCR Cuadruplex (Clermont et al., 2013). La extracción del ADN bacteriano se realizó a 100°C durante 15 minutos. A partir de la suspensión final se tomaron 5 µl como molde para la reacción de

PCR. Las condiciones del proceso se describen en la tabla 2. Los productos de la amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.5 % p/v a 100 V durante 1 h. Para la visualización del gel, se empleó RedSafe™ para su tinción, y se llevó a un transiluminador con luz ultravioleta, acoplado a una cámara digital Canon Power Shot G11.

Tabla 2. Condiciones utilizadas para la detección de los determinantes característicos de los grupos filogenéticos de *E. coli* mediante PCR Quadruplex.

Cebador	Target	Secuencia de primer	Etapas	Ciclos	T°
chuA.1b chuA.2	<i>chuA</i>	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3' 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	Denaturación inicial	1	94°C
yjaA.1b yjaA.2b	<i>yjaA</i>	5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3' 5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	Denaturación Alineación elongación	30	94°C 59°C 72°C
TspE4C2.1b TspE4C2.2b	<i>TspE4.C2</i>	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3' 5'-AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC-3'			
AceK.f ArpA1.r	<i>arpA</i>	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3' 5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'	Elongación final	1	72°C

Identificación mediante Rep-PCR:

Se emplearon cebadores complementarios a las secuencias de polinucleótidos (GTG)₅. Para esto, a partir del ADN extraído, se realizó la Rep-PCR siguiendo el perfil descrito por Healy et al., (2005). Las condiciones de la PCR se describen en la tabla 3. Los amplificados se sometieron a

electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v a 100 V durante 1 h, visualizando bajo las condiciones descritas anteriormente; el análisis filogenético se realizó empleando el programa PyELph con el método de agrupamiento jerárquico aglomerativo simple UPGMA y el coeficiente de similitud de Dice con una tolerancia del 2 % (Rios et al., 2019).

Tabla 3. Condiciones del proceso de la Rep-PCR:

Cebador	Secuencia de primer	Etapas	Ciclos	T°	Tiempo
GTG ₅	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'	Denaturación inicial	1	95°C	2 min
		Denaturación	30	94°C	30 s
		Alineación		90°C	1 min
				72°C	2 min
		Elongación final	1	72°C	8 min

Identificación mediante MLST

Con el fin de establecer las relaciones filogenéticas de las cepas se utilizó la técnica de MLST mediante la amplificación, purificación y secuenciación de siete genes

conservados “housekeeping” (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) que se encuentran en la tabla 4. Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 5 (Wirth et al., 2006).

Tabla 4. Cebadores empleados en la amplificación MLST.

Diana	Cebador	Secuencia 5` - 3`	Tamaño pb
<i>adk</i>	<i>adkF</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583
	<i>adkR</i>	CCGTCAACTTTCGCGTATTT	
<i>fumC</i>	<i>fumCF</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806
	<i>fumCR</i>	GTACGCAGCGAAAAAGATTC	
<i>gyrB</i>	<i>gyrBF</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC	911
	<i>gyrBR</i>	ATCAGGCCTTCACGCGCATC	
<i>icd</i>	<i>icdF</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878
	<i>icdR</i>	GGACGCAGCAGGATCTGTT	
<i>mdh</i>	<i>mdhF1</i>	AGCGGTTCTGTTCAAATGC	932
	<i>mdhR1</i>	CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT	
<i>purA</i>	<i>PurAF</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816
	<i>purAR</i>	CATACGGTAAGCCACGCAGA	
<i>recA</i>	<i>RecAF</i>	CGCATTTCGCTTTACCCTGACC	780
	<i>recAR</i>	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	

Una vez realizada la PCR, los productos obtenidos fueron purificados con el kit (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Mini kit) siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación de los productos de PCR fue realizada en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León utilizando el secuenciador Megabace 500 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). Las secuencias obtenidas se revisaron y editaron visualmente utilizando el Software Chromas Lite 2.1 y alineado con

ClustalW y el algoritmo del software MEGA 7. A cada locus genético se le asignó un número de alelo y una secuencia implementado en la plataforma EnteroBase. El análisis para establecer la agrupación de los aislamientos en complejos clonales involucró 7 secuencias de nucleótidos y hubo un total de 3427 posiciones analizadas para el conjunto final de datos.

Se realizó el árbol filogenético empleando el programa MEGA 7; se obtuvo la relación filogenética utilizando el modelo Kimura.

Tabla 5. Condiciones de la técnica de PCR utilizada para la detección de los genes housekeeping mediante MLST.

<i>adk, fumC, icd y purA</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	54°C	72°C	72°C
Tiempo	2 min	1 min	1 min	2 min	5 min
<i>recA</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
Tiempo	2 min	1 min	1 min	2 min	5 min
<i>gyrB y mdh</i>					
Etapa	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
Temperatura	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
Tiempo (min)	2	1	1	2	5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del grupo filogenético:

Se reveló la presencia de los genes *chuA*, *TspE4.C2* en las cepas analizadas, sin embargo, el gen *yjaA* no fue detectado. La ausencia de este gen podría sugerir que las cepas estarían asociadas al grupo B2, D o E; sin embargo, se detectó una variante del gen *arpA* específica del filogrupo E, permitiendo comprobar que las cepas pertenecían a dicho filogrupo, corroborado,

además, por la detección del gen *trpA*, igualmente asociado a este filogrupo.

Las cepas del filogrupo E son consideradas como patógenos de relevancia clínica e implicadas en procesos infecciosos capaces de producir distintos factores de virulencia, además de tener la capacidad de causar la colonización, adherencia, invasión de enterocitos, así como de evadir los distintos

mecanismos de defensa del hospedero humano (Millán *et al.*, 2014). El gen *arpA* contribuye a la diferenciación filogenética de las cepas ya que está presente en todas las cepas de *E. coli* a excepción de las que pertenecen al grupo filo B2 y F como por ejemplo *Escherichia albertii* y *Escherichia fergusonii* (Hasanpour y Najafi, 2017). Se ha reportado que los genes *chuA*, contribuyen como sistema para transportar el grupo hemo en *E. coli* O157:H7, así mismo se ha revelado que *TspE4.C2* actúa como un gen putativo de lipasa esterasa; por otro lado, se desconoce la función del gen *yjaA* (Hasanpour y Najafi, 2017). El filogrupo E se ha detectado en cepas STEC aisladas a partir de diferentes animales de abasto; en el estudio de Furlan *et al.*, (2019), fue el filogrupo más prevalente en cepas STEC No-O157 aisladas a partir de muestras de heces de ovejas en Brasil. Coura *et al.*, (2017), analizando cepas aisladas de heces de terneros, detectaron el filogrupo E en el 19 % de cepas STEC; de hecho, este filogrupo junto con el A fueron los únicos detectados en los diferentes patotipos de *E. coli* estudiados, confirmando la asociación de estos patotipos con infecciones intestinales (Clermont *et al.*, 2011); García-Meniño *et al.*, (2021), detectaron este

filogrupo en el 90 % de cepas STEC aisladas a partir de colibacilosis en porcinos en España; Goudarztalejerdi *et al.*, (2020) demostraron que fue el principal filogrupo detectado en cepas de *E. coli* de origen aviar. Adicionalmente, el filogrupo E fue uno de los principales filogrupos en cepas de *E. coli* aisladas en muestras de queso no pasteurizado en Brasil (de Campos *et al.*, 2018). Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos por otros autores, como Rúgeles *et al.*, (2010), quienes asignaron las cepas STEC de origen alimentario aisladas en Colombia al filogrupo A y B1.

Identificación mediante REP-PCR:

Los resultados obtenidos del análisis de conglomerados de los perfiles bacterianos mediante GTG5, revelaron un patrón clonal heterogéneo, evidenciando preliminarmente 6 patrones clonales distintos (Tabla 6). Sin embargo, no se observó relación evidente entre estos patrones y el perfil de virulencia de las cepas (Tabla 1).

Esta diversidad genética fue igualmente reportada por otros autores como Hoffmann *et al.*, (2014) en cepas de *E. coli* aisladas a partir de muestras de leche de vaca pasteurizada y Silva *et al.*, (2009) en cepas

de *E. coli* aisladas de hisopados de úteros de vacas lecheras.

Tabla 6. Perfiles clonales detectados en las cepas mediante Rep-PCR.

Perfil I	ST	Perfi I II	Perfil III	Perfil IV	Perfi I V
ST	ST	ST	ST	ST 98	ST
16	82	15	86		74
ST	ST	ST			
20	87	84			
ST	ST				
37	94				
ST	ST				
80	97				

Identificación mediante MLST

Se seleccionó al azar una de las cepas de cada perfil clonal de la tabla 6. Siete genes housekeeping fueron amplificados y secuenciados para las cepas seleccionadas (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*). Se determinaron entre 1 y 5 alelos diferentes entre las distintas cepas (Tabla 7). A pesar de que no se reveló ningún complejo clonal, se evidenciaron nuevos posibles perfiles alélicos no registrados hasta el momento en la base de datos MLST las cuales fueron nombradas como NmD (No Match Detected) mostrando que la mayoría de las cepas poseían una o más secuencias desconocidas, por lo cual no fue posible establecer algún ST bacteriano. El gen *fumC* fue el más variable, mientras que los genes

mdh y *purA* fueron los que mostraron un perfil alélico más estable, y los demás genes con 1 o más secuencias desconocidas (Tabla 8)

Tabla 7. Número de alelos compartidos relacionados entre las cepas STEC estudiadas.

CEPA	15	16	74	86	98
15	7	3	0	1	0
16	3	7	1	1	0
74	0	1	7	1	5
86	1	1	1	7	1
98	0	0	5	1	7

Tabla 8. Perfiles de alelos y frecuencias obtenidas mediante MLST de las cepas analizadas

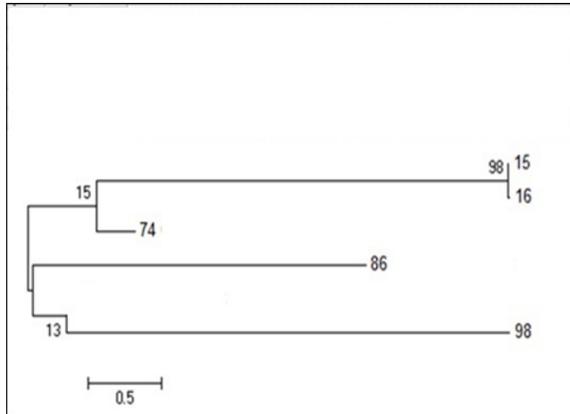
gen cepa	<i>adk</i>	<i>fum C</i>	<i>gyr B</i>	<i>icd</i>	<i>md h</i>	<i>pur A</i>	<i>rec A</i>
15	Nm D	Nm 1	3	16	9	7	7
16	Nm D	Nm 2	Nm D	1251	9	8	7
74	Nm 3	Nm D	Nm D	12	8	8	Nm D
86	Nm 4	Nm 4	32	Nm 1	9	8	Nm 2
98	6	Nm D	5	12	8	8	Nm D

Nm: No match; Nm D: alelos nuevos obtenidos.

Se obtuvo el árbol filogenético empleando el programa MEGA 7 (Figura 1); el análisis involucró 7 secuencias de nucleótidos. Se detectaron diferencias entre las cepas analizadas evidenciándose una clara separación entre ellas, a excepción de las cepas 15 y 16. El análisis individual de las secuencias de los alelos para cada gen en

las cepas mostró que algunas secuencias desconocidas.

Figura 1. Árbol filogenético obtenido mediante el análisis MLST de las cepas STEC analizadas.



En los nodos de las ramas se presentan los valores bootstrapping.

Algunas razones por las que un evento genético como este resulta en nuevas secuencias de posibles alelos desconocidos, es que ocurra por una mutación puntual, bien sea alterando solo un sitio de nucleótidos o por un reemplazo recombinacional, lo que a menudo cambiará múltiples sitios dando

CONCLUSIONES

Las cepas analizadas se clasificaron en el grupo filogenético E, siendo asociadas con patógenos intestinales; mediante la técnica REP-PCR se detectó un patrón clonal heterogéneo que no guarda relación

lugar a nuevas secuencias (Urwin y Maiden, 2003). Hallazgos de resultados similares a este estudio han sido reportados por Cavalcanti *et al.*, (2020) quienes realizaron la tipificación molecular de cepas de *E. coli* relacionadas con infecciones en humanos en Brasil, *obteniendo* que en un 35% de las cepas estudiadas se obtuvieron secuencias sin registrar y sin asignación de ST. De igual forma, Cadona *et al.*, (2016), identificaron 17 (45%) nuevos ST en cepas *E. coli* aisladas de muestras de alimentos y ganado en Argentina. Álvarez-Suárez *et al.*, (2016) reportaron siete nuevos ST en el 90% de cepas STEC no-O157 aisladas a partir de muestras de leche y ambientes de granja de cabras. Furlan *et al.*, (2020) reportaron 11 nuevos ST en cepas de *E. coli* multirresistentes a antibióticos, incluidas cepas STEC, aisladas de muestras de heces y suelo de granjas de cerdos.

aparente con el perfil de virulencia de las cepas.

La técnica de MLST identificó ST no registrados en la base de datos MLST de *E. coli*, lo que podría sugerir que no están filogenéticamente relacionados con cepas

STEC descritas anteriormente y que puedan ser cepas emergentes locales. Se requiere realizar estudios adicionales a las cepas

para corroborarlo, como la Secuenciación del Genoma Completo (WGS).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez-Suárez, M. E., Otero, A., García-López, M. L., Dahbi, G., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J., & Santos, J. A. (2016). Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *International journal of food microbiology*, 236, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.035>

Bouzari, S., Jafari, A., & Aslani, M. (2012). *Escherichia coli*: A brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(3), 102–117.

Cadona, J. S., Bustamante, A. V., González, J., & Sanso, A. M. (2016). Genetic Relatedness and Novel Sequence Types of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated in Argentina. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 93. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00093>.

Cavalcanti, F., Hernandes, T., Takagi, E., Guth, C., Ori, É. de L., Pinheiro, S., De Andrade, S., Oliveira, S., Cergole, C., Francisco, G., & Dos Santos, L. (2020). Virulence profiling and molecular typing of shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) from human sources in Brazil. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020171>.

Clermont, O., Christenson, J., Denamur, E., & Gordon, D. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>

Coura, F. M., de Araújo Diniz, S., Mussi, J., Silva, M. X., Lage, A. P., & Heinemann, M. B. (2017). Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia microbiologica*, 62(2),

139–144. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0480-9>

De Campos, A., Puño-Sarmiento, J. J., Medeiros, L. P., Gazal, L., Maluta, R. P., Navarro, A., Kobayashi, R., Fagan, E. P., & Nakazato, G. (2018). Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. *Foodborne pathogens and disease*, 15(2), 94–100. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2345>

ECDC. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). 2019. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5926>

Furlan JPR, da Silva Ferreira ME, Stehling EG. Genetic Diversity of Multidrug-Resistant CMY-Producing *Escherichia coli* from Feces and Soil in a Small-Scale Pig Farm. *Microb Drug Resist*. 2020 Nov;26(11):1365-1371. doi: 10.1089/mdr.2020.0090. Epub 2020 May 6. PMID: 32379997.

Furlan, J., Gallo, I., de Campos, A., Navarro, A., Kobayashi, R., Nakazato, G., &

Stehling, E. G. (2019). Characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) obtained from feces of sheep in Brazil. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(9),134. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2712-z>

García-Meniño, I., García, V., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Blanco, J., & Mora, A. (2021). Clones of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* implicated in swine enteric colibacillosis in Spain and rates of antibiotic resistance. *Veterinary microbiology*,252,108924. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108924>

Goudarztalejerdi, A., Mohammadzadeh, A., Najafi, S. V., Nargesi, F., & Joudari, S. (2020). Serogrouping, phylotyping, and virulence genotyping of commensal and avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers in Hamedan, Iran. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*,73,101558. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101558>

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

- Hasanpour, M., & Najafi, A. (2017). Development of a multiplex real-time PCR assay for phylogenetic analysis of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 137, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.03.009>
- Healy, M., Huong, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R., Woods, C., Versalovic, J., & Lupski, J. R. (2005). Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 199–207. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.199>
- Herrera, F., Santos, J., & Villamizar, R. (2019). Primer reporte de *Escherichia coli* productora de Toxina Shiga no O157 que codifica el gen de la enterohemolisina en carne cruda en Colombia. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 69, 59–67.
- Hoffmann, S. A., Pieretti, G. G., Fiorini, A., Patussi, E. V., Cardoso, R. F., & Mikcha, J. M. (2014). Shiga-toxin genes and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from pasteurized cow milk in Brazil. *Journal of food science*, 79(6), M1175–M1180. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12477>
- ICMSF. *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. 2nd edition. A second, further updated edition is published as New York: Kluwer Academic & Plenum Publishers, 2005.
- Martínez, A. J., Bossio, C. P., Durango, A. C., & Vanegas, M. C. (2007). Characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* isolated from foods. *Journal of food protection*, 70(12), 2843–2846. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.12.2843>
- Millán, Y., Hernández, E., Millán, B., & Araque, M. (2014). Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), 175–181. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70069-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70069-0)
- Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. (2015). Resolución 0719 de 11 de marzo. Por el cual se establece la clasificación de alimentos para consumo humano de acuerdo con el riesgo en salud pública.

- Mohapatra, B., Broersma, K., & Mazumder, A. (2008). Differentiation of fecal *Escherichia coli* from poultry and free-living birds by (GTG)5-PCR genomic fingerprinting. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(3–4), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.019>
- Nazaret, E. (2009). *Escherichia coli* Shiga Toxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, v.29 n.1, 13-20. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100004&lng=es&tlng=es.
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., Castro-Nallar, E., (2017). Multilocus sequence typing of pathogens, in: Tibayrenc, M. (Ed.), *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*. Elsevier, Amsterdam, pp. 383–404. doi:10.1016/B978-0-12-799942-5.00016-0
- Rios, E., Santos, J., García, I., Flament, S., Blanco, J., García, M., Otero, A., Rodríguez, J. (2019). Characterisation, antimicrobial resistance and diversity of atypical EPEC and STEC isolated from cow's milk, cheese and dairy cattle farm environments. *Lwt*, 108, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.062>
- Rojas-Lopez, M., Monterio, R., Pizza, M., Desvaux, M., & Rosini, R. (2018). Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. *Frontiers in microbiology*, 9, 440. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00440>
- Rúgeles, L. C., Bai, J., Martínez, A. J., Vanegas, M. C., Gómez-Duarte, O. G. (2010). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*, 138(3), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.034>
- Silva, E., Leitão, S., Tenreiro, T., Pomba, C., Nunes, T., Lopes da Costa, L., & Mateus, L. (2009). Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 6000–6010. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2358>
- Tack, D. M., Ray, L., Griffin, P. M., Cieslak, P. R., Dunn, J., Rissman, T., Jarvis, R., Lathrop, S., Muse, A., Duwell, M., Smith, K.,

Tobin-D'Angelo, M., Vugia, D. J., Zablotsky Kufel, J., Wolpert, B. J., Tauxe, R., & Payne, D. C. (2020). Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016-2019. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 69(17), 509–514.
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6917a1>

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>

Urwin, R., Maiden, M. C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in microbiology*, 11(10),479–487.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.08.006>

World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Food: Attribution, Characterization, and Monitoring: Report.
<https://www.who.int/publications/item/9789241514279>

Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L., Karch, H., Reeves, P., Maiden, M., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5),1136–1151.