

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 811**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2010 PCT/IB2010/053631**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO2011018762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2010 E 10752414 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2464746**

54 Título: **Un ensayo para determinar una evaluación del riesgo molecular de una muestra polimicrobiana compleja sospechosa de contener un EHEC**

30 Prioridad:

**11.08.2009 EP 09290621**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**02.06.2017**

73 Titular/es:

**AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET  
DU TRAVAIL (100.0%)**

**27-31, Avenue du Général Leclerc  
94700 Maisons-Alfort, FR**

72 Inventor/es:

**FACH, PATRICK;  
BUGAREL, MARIE y  
BEUTIN, LOTHAR**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 614 811 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Un ensayo para determinar una evaluación del riesgo molecular de una muestra polimicrobiana compleja sospechosa de contener un EHEC

Desde los comienzos de la década de 1980, *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) han emergido como una causa grave de infecciones transmitidas por los alimentos (Karmali et al. 1983, Riley et al. 1983). Las STEC pueden causar diarrea en humanos y algunas cepas de STEC pueden causar enfermedades con riesgo para la vida tales como Colitis Hemorrágica (HC) y Síndrome Urémico Hemolítico (HUS). Éstas últimas cepas también se han denominado como *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) de acuerdo con su patogenicidad en seres humanos (Levine 1987, Nataro y Kaper 1998). Se han atribuido numerosos casos de HC y HUS a cepas de EHEC de serotipo O157:H7, pero ahora se ha reconocido que otros serotipos de STEC pertenecen al grupo de las EHEC. Se ha desarrollado una clasificación de seropatotipos de STEC (de A a E) basada en la asociación del serotipo con la epidemiología humana, HUS y diarrea, como una ayuda para evaluar los riesgos clínicos y de salud pública asociados a cepas de EHEC y STEC no-O157 (Karmali et al. 2003). Datos recientes de Enter-Net, un consorcio de vigilancia global de 35 países que rastrea las enfermedades entéricas infecciosas, mostraron que el número de enfermedades humanas causadas por STEC y EHEC no-O157 aumentó globalmente un 60.5% entre los años 2000 y 2005, mientras que al mismo tiempo el número de casos ligados a EHEC O157 aumentó únicamente un 13% (Anónimo 2005). Entre los cinco serotipos EHEC no-O157 más frecuentemente implicados en enfermedades hemorrágicas en 2005, el 80% pertenecen al seropatotipo B y el 20% pertenecen a seropatotipo C (Anónimo 2005). Ninguno pertenece a los seropatotipos menos virulentos D y E de STEC, lo que sugiere que actualmente tiene lugar una selección de cepas altamente virulentas.

La producción de la toxina Shiga por parte de EHEC es el primer rasgo de virulencia responsable del HUS, pero muchas cepas de *E. coli* no-O157:H7 que producen toxina Shiga no causan HUS. La identificación de STEC virulentas para humanos mediante detección única de genes *stx* puede ser engañosa ya que no todas las cepas de STEC son significativas clínicamente para los humanos (EFSA 2007). Además, para producir uno o ambos tipos de toxina Shiga, las cepas EHEC típicas albergan una isla genómica, llamada el "locus de borrado del enterocito" (LEE). Este locus se identificó por primera vez en *E. coli* enteropatogénicas (EPEC), causa predominante de diarrea infantil en países en desarrollo. El LEE lleva genes que codifican funciones para la colonización bacteriana del intestino y para la destrucción de la mucosa intestinal, por consiguiente que contribuyen al proceso de enfermedad (Nataro y Kaper 1998). La intimina, producto codificado por el gen *eae* de LEE, está directamente involucrada en el proceso de adherencia y borrado (A/E) y sirve como indicador de la función A/E en las bacterias (Zhang et al. 2002). Se ha identificado una heterogeneidad considerable entre las secuencias de ADN de los genes *eae*, especialmente en sus regiones 3' terminales, lo cual ha llevado a la clasificación de al menos 21 subtipos de intimina. Entre ellos, el subtipo *eae-γ* se ha encontrado comúnmente en EHEC O157:H7 y O145:H28, mientras que los subtipos *eae-β*, *eae-ε* y *eae-θ* se han detectado comúnmente en EHEC O26:H11, O103:H2, y O111:H8 respectivamente (Oswald et al. 2000; Tarr y Whittam 2002).

El LEE incluye elementos regulatorios, un sistema de secreción de tipo III (TTSS), proteínas efectoras secretadas, y su chaperona relacionada (Elliott et al. 1998, Perna et al. 1998). Además de la intimina, la mayoría de las cepas típicas de EHEC albergan la enterohemolisina (*ehxA*) codificada en un plásmido, la cual se considera un factor asociado a la virulencia (Nataro y Kaper 1998). Sin embargo, el LEE y la enterohemolisina no se encuentran en todas las STEC que causan HC y HUS y las cepas correspondientes se denominaron como EHEC atípicas (Nataro y Kaper 1998). Las EHEC atípicas están involucradas en enfermedades hemorrágicas con menos frecuencia que las EHEC típicas, pero son una causa frecuente de diarrea, lo cual indica que determinantes de virulencia adicionales tienen un papel en la patogenicidad (Brooks et al. 2005; Eklund et al. 2001).

La adquisición de elementos genéticos móviles tales como las islas genómicas modula la virulencia de los patógenos bacterianos (Lawrence 2005). Una clase de islas genómicas, llamadas islas de patogenicidad (PAIs), constituyen un conjunto flexible de genes que contribuyen a la evolución de los patógenos y al potencial de virulencia y se pueden utilizar como una firma genética de patógenos nuevos y emergentes. En EHEC y en cepas de *E. coli* enteropatogénicas (EPEC) se han descrito un gran número de efectores de tipo III codificados en PAI fuera del LEE.

Existen técnicas para determinar la presencia de una contaminación de STEC en una muestra, por ejemplo, detectar la presencia de los genes *stx1/stx2* y del gen *eae* (Loukiadis et al. 2006). Pero como se explica anteriormente la base genética de la patogenicidad de STEC es mucho más compleja que la presencia o la ausencia de uno o ambos de estos genes. En una muestra compleja, la cual puede comprender una mezcla de cepas, la presencia de los genes *stx1/2* y del LEE tampoco indica siempre la presencia de una EHEC en esa muestra.

Por lo tanto, actualmente no existen análisis fiables para cribar la presencia de EHEC en una muestra polimicrobiana compleja (p. ej. muestras alimentarias, fecales, ambientales). Dado que algunas cepas de EHEC pueden causar problemas de salud muy graves en humanos, los trabajadores que utilizan los métodos existentes deben descartar una muestra cada vez que en la misma se detecta una cepa STEC; a pesar de que es probable que esta STEC no plantee una amenaza para la salud humana. Por tanto, los métodos existentes resultan en una gran cantidad de desperdicio debido a la falta de discriminación entre cepas no patogénicas de STEC y cepas de EHEC.

Además, debido a la naturaleza de las muestras que se analizan, éstas pueden comprender varias cepas bacterianas diferentes cada una de las cuales comprende de un complemento diferente de genes y por consiguiente cada una de las cuales presenta un nivel diferente de posible patogenicidad.

- 5 Por lo tanto, se requiere un análisis más complejo y matizado para permitir una evaluación más completa del riesgo molecular para llevarse a cabo sobre una muestra sospechosa de comprender una STEC, este nuevo ensayo debería ser capaz de determinar el riesgo planteado / la patogenicidad de una cepa contaminante particular de STEC. Este ensayo también debería permitir, a causa de su mayor complejidad, la identificación de cepas virulentas conocidas de EHEC que en la actualidad no pueden identificarse rutinariamente en una muestra.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

- 10 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para llevar a cabo una evaluación del riesgo molecular (MRA) sobre una muestra sospechosa de contener una *Escherichia coli* que codifica la toxina Shiga (STEC), que comprende las etapas:

Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- 15 - *stx1*;  
- *stx2*; y los siguientes genes diana: *espK* o *espK* y *eae*;

en dónde dicho proceso se caracteriza por que también comprende poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- *nleB*;  
20 - *nleH1-2*;  
- *nleE*;  
- *ent/espL2*;

y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación de cada uno de dichos genes diana.

- 25 Este proceso permite una evaluación del riesgo molecular detallada para realizarse sobre una muestra sospechosa de contener una STEC contaminante y en esta evaluación del riesgo un trabajador puede identificar qué gen del panel de genes diana seleccionado comprende la cepa contaminante y a partir de esto determinar si esta cepa contaminante plantea una amenaza para la salud humana o no. En particular este proceso puede utilizarse para determinar si una cepa de STEC es una cepa de EHEC o no. Los inventores han demostrado que la presencia de todos estos genes diana en una cepa se correlaciona con que la cepa sea una cepa de EHEC.

- 30 Los genes *stx1* y *stx2* codifican las toxinas shiga y su presencia es por lo tanto esencial para la patogenicidad. El gen *eae* (intimina) se codifica en la isla genómica LEE y por lo tanto es un marcador útil de esta isla genómica, la cual se sabe que está asociada con las cepas de EHEC típicas y con las cepas de EPEC. Los inventores también han establecido que algunos genes *nle* o alelos de estos genes y el gen *espK* (Z1829) están ligados a cepas de EHEC y por lo tanto pueden utilizarse en lugar o además de *eae*.

- 35 Algunas cepas de EHEC y de EPEC también comparten otras islas genómicas además de LEE que codifican varias proteínas efectoras. Grandes paneles de genes *nle* que están más o menos asociados con la virulencia de *E. coli* codifican estas proteínas efectoras no codificadas en LEE.

- 40 Consecuentemente, la presencia de únicamente uno de los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *espK* y de un gen *nle* seleccionado, tal como *nleB*, no proporciona información suficiente para predecir de manera definitiva la presencia de una EHEC en una muestra polimicrobiana compleja (p. ej. muestras alimentarias o fecales). Como una serie de alimentos que no están contaminados por EHEC comprenden bacterias con al menos uno de estos genes, éstos no pueden utilizarse por sí mismos como un marcador de EHEC. Sin embargo, cuando el complemento mínimo de acuerdo con este primer aspecto de la presente invención está presente en la misma muestra, éste puede utilizarse como un predictor fiable de virulencia tal como se demuestra a continuación.

- 45 Dado el hecho de que no es realista conseguir un marcador único de cepas de EHEC como se ha logrado para otras bacterias patógenas tales como *Salmonella* spp., los inventores han desarrollado y refinado un proceso basado en la detección de dianas seleccionadas para cribar muestras polimicrobianas (p. ej. muestras alimentarias, fecales y ambientales). Este proceso se basa en una estrategia multiparamétrica basada en la detección de *stx1/2* y *eae* (y/o *espK*) junto con al menos los genes siguientes: *ent/espL2*, *nleB*, *nleE* y *nleH1-2*.

- 50 Los genes *nle* pueden derivar de diferentes elementos genéticos móviles, incluyendo islas genómicas. Los inventores focalizaron sus esfuerzos en la detección de los genes de dos islas genómicas: los genes de OI#122

*ent/espL2* (Z4326), *nleB* (Z4328), *nleE* (Z4329) y los genes de OI#71: *nleF* (Z6020), *nleH1-2* (Z6021), *nleA* (Z6024). Encontraron que los genes de OI#122 *ent/espL2* (Z4326), *nleB* (Z4328), *nleE* (Z4329) y el gen de OI#71 *nleH1-2* (Z6021) (los nombres entre paréntesis son identificadores únicos de Genbank), estaban estrechamente asociados con cepas de EHEC típicas y con algunas cepas de EPEC.

- 5 Por lo tanto este proceso en primer lugar permite a un trabajador determinar de manera rutinaria si una muestra contiene una STEC contaminante o no y en segundo lugar permite a un trabajador determinar si es probable que esta cepa de STEC sea una cepa de EHEC o no.

10 Todas las etapas de este proceso pueden llevarse a cabo a la vez utilizando por ejemplo una serie de reacciones de amplificación o una reacción de amplificación múltiple. A modo de ejemplo, los inventores han utilizado una reacción de amplificación múltiple basada en el sistema GeneDisc®. El sistema GeneDisc® es una innovación reciente en el campo de la amplificación de ADN que utiliza tecnología de PCR GeneSystems® (Beutin et al. 2009) que permite la detección simultánea de múltiples dianas en microcámaras de reacción precargadas con los reactivos necesarios para detectar y cuantificar los dianas requeridas (Beutin et al. 2009; Yaradou et al. 2007).

15 Alternativamente, las etapas pueden llevarse a cabo en diferentes momentos. Por ejemplo, una muestra puede analizarse inicialmente para la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* y/o *espK*. Si los resultados de esta reacción son positivos la muestra puede analizarse entonces para la presencia de los restantes determinantes de virulencia *nleB*, *nleH1-2*, *nleE* y *ent/espL2* y utilizando ambos sets de resultados se hace una MRA.

20 En la presente invención cualquier set de cebadores apropiados puede utilizarse para amplificar un gen diana con el objetivo de producir un producto de amplificación detectable. Más normalmente este será un par de cebadores separados mutuamente por varios pares de bases en el gen diana. Sin embargo, un único cebador puede utilizarse si éste da lugar a un producto de amplificación detectable o alternativamente más de dos cebadores pueden utilizarse para amplificar uno o más de los genes diana. La presente invención incluye todas tales variaciones.

En particular la presente invención proporciona un proceso para llevar a cabo una MRA sobre una muestra sospechosa de contener una EHEC, que comprende las etapas:

- 25 poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- *stx1*, utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- 30 - *stx2* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos; y al menos uno de los siguientes genes diana:

- *eae* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *espK* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- 35 en donde dicho proceso se caracteriza por que también comprende poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- *nleB* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 80 o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- 40 - *nleH1-2* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *nleE* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *ent/espL2* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- 45 y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana.

Los inventores han encontrado que este proceso puede utilizarse para identificar un amplio rango de cepas de EHEC O157 así como otras cepas patógenas de EHEC de serotipos diferentes, por ejemplo O103, O111, O26, O145, O5, O55, O45, O118, O121, O123, O165, O172, O15. Todas las cepas de STEC *eae*-negativas también fueron negativas para el set de genes *nle* investigados en este estudio. Por el contrario, los genes *nle* estaban presentes en EHEC típicas, incluidos los nuevos serotipos emergentes. EHEC atípicas p. ej. O91:H21 y O113:H21, conocidas por raramente causar brotes y por ser de baja incidencia (EFSA 2007), dieron negativo en los análisis para los genes *nle*.

Por lo tanto, los inventores han demostrado que la detección simultánea de las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*), la intimina (*eae*), junto con algunos genes efectores no-LEE que pertenecen a la isla genómica O OI#71 y al módulo 2 de la OI#122 proporcionan una estrategia exhaustiva para la evaluación del riesgo molecular de la virulencia de STEC.

5 En particular el proceso también comprende poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de al menos uno de los siguientes genes diana:

- *ehxA* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

10 - *nleF* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *nleA* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos.

15 El gen *ehxA* se presenta en el plásmido pO157 frecuentemente encontrado en cepas de EHEC. Los genes *nleF* (Z6020) y *nleA* (Z6024) extraídos de la PAI isla O 71 estaban desigualmente distribuidos en los aislados EHEC y su prevalencia fue respectivamente del 72,76% y del 79%, que es mucho menor que la prevalencia de *nleH1-2* (Z6021), el cual únicamente se encontró ausente en una cepa O26:H11 de entre las varias cepas analizadas por los inventores.

20 De acuerdo con la presente invención los productos de amplificación pueden generarse utilizando cualquier técnica de amplificación de ADN adecuada, tales como PCR en forma simple o múltiple, utilizando cualquiera de las enzimas naturales o sintéticas disponibles para este propósito. También podrían utilizarse para generar los productos de amplificación métodos alternativos tales como amplificaciones basadas en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), ADN ramificado, amplificación por desplazamiento de cadena y método de amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP) (Compton 1991; Chang 1991; Walker et al. 1992; Notomi et al. 2000).

25 En particular los productos de amplificación, cuando se presentan, se detectan utilizando una sonda degenerada definida para cada gen diana mediante la siguiente secuencia:

- *stx1*, SEQ ID NO: 3, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;

- *stx2*, SEQ ID NO: 6, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;

- *eae*, SEQ ID NO: 9, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;

- *espK*, SEQ ID NO: 84, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;

30 - *ehxA*, SEQ ID NO: 12, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;

- *nleF*, SEQ ID NO: 24, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;

- *nleB*, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 81, o un fragmento de las mismas de al menos quince nucleótidos;

- *nleH1-2*, SEQ ID NO: 27, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;

- *nleE*, SEQ ID NO: 21, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;

35 - *nleA*, SEQ ID NO: 30, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;

- *ent/espL2*, SEQ ID NO: 15, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos.

En particular el proceso comprende además llevar a cabo un control de amplificación negativa y/o un control de inhibición; y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación de dichas reacciones.

40 En los procesos que conciernen aspectos de salud humana, es deseable en la medida de lo posible garantizar que los resultados del ensayo sean tan precisos y fiables como sea posible. Para ello, el ensayo puede comprender varios controles internos y externos para garantizar que los resultados del ensayo son representativos de los verdaderos contenidos de la muestra. Por lo tanto, el presente proceso puede comprender un control de amplificación negativo para garantizar que cualquiera de los productos detectados son verdaderos positivos y el proceso también puede comprender un control de inhibición para garantizar que el ADN de la muestra puede  
45 amplificarse y por consiguiente, que no se generan falsos negativos.

Además de estos tipos de controles experimentales internos, el proceso también puede llevarse a cabo varias veces y juntar los resultados para conseguir un resultado más representativo.

En particular las sondas están marcadas con al menos una etiqueta fluorescente.

Ejemplos no limitantes de etiquetas fluorescentes apropiadas incluyen 6-carboxilfluoresceína (FAM), tetracloro-6-carboxilfluoresceína (TET), 6-carboxi-X-rodamina (ROX). Ejemplos no limitantes de inhibidores de la fluorescencia apropiados para marcar sondas doblemente marcadas incluyen 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA), DABCYL, Inhibidores de fluorescencia No Fluorescentes tales como inhibidores de fluorescencia de la familia de Inhibidores de fluorescencia Agujero Negro (BHQ), o que incluyen un grupo de unión al surco menor (MGB).

En particular en donde los productos de amplificación se generan utilizando una reacción de amplificación múltiple.

Alternativamente los productos de amplificación se generan utilizando una serie de reacciones de amplificación simples/independientes.

En particular en donde las reacciones de amplificación se llevan a cabo en una macromatriz.

10 De acuerdo con la presente Solicitud de Patente una macromatriz se utiliza para describir una estructura realizada como un sustrato sobre el cual se han situado en puntos varios cebadores de ADN, siendo estos cebadores aquellos descritos de acuerdo con los diferentes aspectos de la presente invención. Por lo tanto, tal macromatriz permite la realización rutinaria de uno o más de los ensayos de detección descritos en la presente memoria.

15 La manera de llevar a cabo el proceso preferida por los inventores es una matriz GeneDisc que permite el análisis simultáneo de los genes que codifican las toxinas Shiga 1 y 2 (*stx1* y *stx2*), la intimina (*eae*), la enterohemolisina (*ehxA*) y seis genes *nle* diferentes derivados de las islas genómicas OI#71 y OI#122 (módulo 2).

20 Los determinantes de virulencia asociados a EHEC se detectaron de manera fiable con el ensayo de GeneDisc, presentándolo como una herramienta de detección apropiada para diagnósticos rutinarios. A diferencia de muchas otras pruebas de diagnóstico, los resultados se obtienen sin necesidad de equipamiento de laboratorio especial ni de personal preparado específicamente y el ensayo se lleva a cabo en un tiempo muy corto. Por consiguiente, tal macromatriz de baja densidad representaría una herramienta de evaluación del riesgo molecular innovadora y eficiente para la monitorización rutinaria de aislados de STEC y para la identificación de cepas de EHEC clásicas y de nuevas cepas de EHEC emergentes.

En particular en donde la reacción de amplificación es una reacción de PCR en tiempo real.

25 La PCR en tiempo real, también llamada reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) o reacción en cadena de la polimerasa cinética, se utiliza para simultáneamente amplificar y cuantificar una molécula diana de ADN. Permite ambas, detección y cuantificación (como número absoluto de copias o cantidad relativa cuando se normaliza con el ADN de entrada o con genes adicionales de normalización) de una secuencia específica en una muestra de ADN. El proceso sigue el principio general de la reacción en cadena de la polimerasa; la característica clave es que el ADN amplificado se cuantifica a medida que se acumula en la reacción en tiempo real después de cada ciclo de amplificación (Mackay 2007). Dos métodos comunes de cuantificación son el uso de marcadores fluorescentes que se intercalan con el ADN de doble cadena, y sondas de ADN de oligonucleótidos modificados que emiten fluorescencia cuando se hibridan con un ADN complementario (Mackay 2007).

Un método de RT-PCR preferido utiliza el sistema GeneDisc como se describe a continuación.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un proceso para llevar a cabo una evaluación del riesgo molecular sobre una cepa de STEC, en donde dicho proceso se caracteriza por que también comprende poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de al menos uno de los siguientes genes diana:

40 - *nleB*, utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 80 o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *nleH1-2*, utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *nleE*, utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

45 - *ent/espL2*, utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana.

Además de los cebadores especificados, también pueden utilizarse otros cebadores para los genes diana especificados y se incluyen en este aspecto de la presente invención.

50 Por lo tanto la presente invención también proporciona un proceso para llevar a cabo una evaluación del riesgo molecular sobre una muestra que se sabe que comprende una cepa de STEC. En donde la presencia de los genes

diana enumerados indica que es probable que la cepa de STEC sea una cepa de EHEC y por consiguiente peligrosa para la salud humana.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para predecir el serotipo de una cepa de STEC basado en el patrón de genes *nle* presentes en una muestra. Este método comprende las etapas de:

- 5
- Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:
- *nleB* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 80 o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - 10 - *nleH1-2* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *nleE* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - 15 - *ent/espL2* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *nleF* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *nleA* utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - 20 y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana.

Los inventores han encontrado que el patrón de genes *nle* presente en una cepa difiere entre diferentes cepas y por consiguiente puede utilizarse para distinguir entre cepas de EHEC diferentes.

Se encontró un patrón *nle* característico [*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleF*, *nleH1-2*, *nleA*] asociado con las cepas de EHEC O157:[H7], O111:[H8], O26:[H11], O103:[H25], O118:[H16], O121:[H19], O5:[H<sub>NM</sub>], O55:[H7], O123:[H11], O172:[H25], y O165:[H25]. Curiosamente, las cepas *stx2* fermentadoras de sorbitol (SF) O157:[H<sub>NM</sub>], y las cepas O-rough:[H7] (*stx2*, *eae*-gamma), que fueron identificadas previamente como positivas para el gen *rfbE*<sub>O157</sub> mostraron el mismo perfil de virulencia típico.

25

Esta estrategia también se puede utilizar para identificar varias de las nuevas cepas de EHEC emergentes que recientemente se declararon como patógenos humanos graves. Una de ellas es la cepa de EHEC tipo O103:H25, responsable de un brote de HUS de transmisión alimentaria en Noruega en 2006 (Schimmer et al. 2008), la cual tuvo el mismo perfil de *nle* que EHEC O157:[H7], que es [*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleF*, *nleH1-2*, *nleA*].

30

Otra cepa emergente de EHEC tipo O5:H<sub>NM</sub> aislada de carne de res, productos lácticos y pacientes humanos con HC (McLean et al. 2005) muestra el mismo patrón *nle* [*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleF*, *nleH1-2*, *nleA*]. Curiosamente, la EHEC O118:H16/H<sub>NM</sub> que actualmente emerge como un tipo altamente virulento de STEC en Europa (Maidhof et al. 2002) muestra este mismo patrón *nle* [*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleF*, *nleH1-2*, *nleA*] que es característico de EHEC O157:H7 y de la mayoría de las cepas analizadas de EHEC típicas.

35

En base a los análisis de PCR descritos de acuerdo con la invención, los inventores han encontrado que no todas las EHEC poseen un patrón *nle* completo (todos los seis genes diana *nle* enumerados anteriormente). Mediante el uso de los cebadores y sondas descritos en la invención, las cepas de EHEC de los serotipos O103:H2, O145:H28 mostraron un segundo patrón *nle* característico con señales positivas para únicamente [*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleH1-2*]. Utilizar otros cebadores o sondas para detectar los mismos genes puede resultar en un patrón totalmente diferente. Por consiguiente, Kreuzburg y Schmidt (2007) utilizando cebadores diferentes declaran la detección de *nleA* en algunas cepas O103:H2. También declaran la existencia en cepas de *E. coli* de 11 variantes diferentes de *nleA*, mostrando que, como los otros genes *nle*, el *nleA* es probablemente genéticamente variable.

40

Mediante el uso de cebadores y sondas de la invención, se encontró que otras EHEC recientemente emergentes O15:H2 y O45:H2, las cuales son clones altamente virulentos involucrados en HUS, poseen el mismo patrón *nle* [*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleH1-2*] que las cepas de EHEC O103:H2 y O145:H28.

45

Los resultados globales indican que las EHEC constituyen un grupo heterogéneo que comparte un núcleo común de determinantes de virulencia *nle* pero que también albergan muchos genes *nle* variables que son específicos de la cepa y/o el serotipo, probablemente reflejando la adaptación de estas cepas a diferentes hospedadores o nichos ambientales. Es digno de atención que la presencia en la misma cepa de un núcleo de determinantes de virulencia [*eae*, *ent/espL2*, *nleB*, *nleE* y *nleH1-2*] es una firma fuerte de una EHEC patógena que puede causar enfermedades y mortalidad en humanos. Los inventores han demostrado que estos factores de virulencia se encuentran en todas

50

las EHEC típicas y también en nuevos tipos de EHEC emergentes en Europa y Norte América p. ej. O5:H<sub>NM</sub> (McLean et al. 2005), O15:H2 (Starr et al. 1998), O118:H16 (Maidhof et al. 2002), O121:H19 (Brooks et al. 2005).

5 Por lo tanto, en particular en donde el patrón *nle* es: [*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleF*, *nleH1-2*, *nleA*], es probable que la cepa de EHEC pertenezca al grupo que comprende: O157:[H7], O111:[H8], O26:[H11], O118:[H16], O121:[H19], O5:[HNM], O55:[H7], O123:[H11], O172:[H25], O165:[H25], O157:[HNM], O103:[H25], O5:[HNM], O118:[H16/HNM]; o [*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleH1-2*], es probable que la cepa EHEC pertenezca al grupo que comprende EHEC O103:[H2], O145:[H28], O15:[H2] y O45:[H2].

10 Además varias cepas de *E. coli stx* - negativas, *eae* - positivas pertenecen a serotipos asociados a EHEC que se parecen a cepas EHEC de acuerdo con sus genotipos *eae* y sus patrones de genes *nle*. Parece probable que estas cepas representen remanentes de cepas de EHEC que han perdido sus genes *stx*. Por consiguiente, el ensayo de genotipado de *nle* podría ser útil para detectar remanentes de EHEC en pacientes de HUS que se declaró que excretan frecuentemente EHEC que han perdido sus genes *stx* con sus heces (Bielaswezska et al. 2007). Los genes *nle*, en diferentes distribuciones, también se detectaron en algunas cepas de EPEC (O113:H6, O127:H6, O128:H2, O156:H8, O55:H6, O55:H7, O84:H2 y O86:H40). A diferencia de los resultados declarados por Kreuzburg y Schmidt (2007), en nuestro estudio la cepa de EPEC E2348/69 (O127:H6) dio positivo en el análisis para *nleA* (Z6024). El hecho de que estas cepas de EPEC lleven múltiples tipos de genes *nle* es un indicador claro del papel que estos efectores podrían jugar en la diarrea en niños inducida por EPEC. Estos genes *nle* estaban ausentes en especies de *Enterobacteriaceae* aisladas frecuentemente de heces humanas y en *E. coli* fecal que representa la flora de los excrementos de niños sanos. Esto es otra evidencia de que la caracterización de la virulencia de *nle* es apropiada para una caracterización rápida de cepas altamente virulentas de *E. coli Stx* – positivas.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit para la detección de organismos productores de toxina shiga, que comprende al menos un set de cebadores para los genes diana:

- *stx1*; *stx2*; *espK* o *espK* y *eae*;

- *nleB*;

25 - *nleH1-2*;

- *nleE*;

- *ent/espL2*;

y opcionalmente un set de sondas para detectar los productos de amplificación para cada gen diana.

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que consiste en el producto de amplificación que resulta de un proceso de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un proceso para llevar a cabo una evaluación del riesgo molecular (MRA) sobre una muestra sospechosa de contener una *Escherichia coli* codificadora de toxina Shiga (STEC), que comprende las etapas:

35 a) Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- *stx1*;

- *stx2*; y los siguientes genes diana:

- *espK* o *espK* y *eae*;

40 y con un par de cebadores derivados de al menos uno de los siguientes genes diana:

- *nleB*;

- *nleH1-2*;

- *nleE*;

- *ent/espL2*;

45 Y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana; y si se detectan los productos de amplificación entonces:

b) poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con uno o más pares de cebadores derivados del gen diana *eae* y determinar el subtipo *eae*.



De acuerdo con un aspecto preferido de la presente descripción en la etapa a) se determina la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* o *espK* y o *nleB* o *ent/espL2*.

5 De acuerdo con un aspecto preferido adicional de la presente invención en este ensayo se detecta la presencia del alelo específico *nleB2* del gen *nleB* utilizando al menos un cebador seleccionado del grupo SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 80 o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos. El producto de tal reacción de amplificación se detecta utilizando una sonda que consiste en la SEQ ID NO: 81 o un fragmento de la misma de al menos 15 nucleótidos. En particular, los inventores han establecido una conexión entre la presencia del alelo *nleB2* y que la cepa hospedadora sea una EHEC más que una EPEC.

10 El gen *eae* codifica varios subtipos diferentes de los cuales se conocen actualmente 21 y un número menor se encuentra en muestras rutinariamente. Estos genotipos *eae* se pueden distinguir rutinariamente en base a sus secuencias utilizando una reacción de PCR (Nielsen y Andersen 2003), además de mediante otros medios tales como secuenciación, hibridación de tipo southern y otros tipos de reacciones de amplificación.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención en la etapa b), se detectan los subtipos de *eae*  $\gamma$ , *eae*  $\beta$ , *eae*  $\theta$ , y *eae*  $\epsilon$ .

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se determina el subtipo *eae* mediante un método que comprende las etapas de:

Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

20 - *eae*  $\gamma$  utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *eae*  $\beta$  utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 50, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *eae*  $\theta$  utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

25 - *eae*  $\epsilon$  utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana.

30 En particular estas reacciones podrían ser reacciones de PCR en tiempo real, en cuyo caso se podrían detectar sondas para los productos de amplificación de cada uno de ellos, *eae*  $\gamma$ , *eae*  $\beta$ , *eae*  $\theta$  y *eae*  $\epsilon$ , utilizando sondas definidas por SEQ ID NO: 54 para *eae*  $\gamma$ , SEQ ID NO: 51 para *eae*  $\beta$ , SEQ ID NO: 66 para *eae*  $\theta$  y SEQ ID NO: 60 para *eae*  $\epsilon$ .

35 Además, la presente invención también incluye la detección de otros subtipos *eae* tales como *eae*  $\alpha$  y *eae*  $\zeta$ , utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos para *eae*  $\alpha$  y/o utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos para *eae*  $\zeta$ .

De nuevo, tales reacciones de detección son preferiblemente reacciones de PCR en tiempo real, en cuyo caso se podrían utilizar respectivamente las sondas definidas por SEQ ID NO: 48 para *eae*  $\alpha$  y SEQ ID NO: 63 para *eae*  $\zeta$ .

40 Los inventores han encontrado que en cepas de EHEC hay una correlación entre el subtipo del gen *eae* y ciertos seropatótipos (o serogrupos). Por lo tanto la presencia de los genes *stx1/2* y *eae* y de gen(es) *nle* seleccionados (p. ej. *nleB*) junto con un cierto subtipo de *eae* y serotipo es fuertemente indicativo de que la muestra analizada comprende una cepa de EHEC.

De acuerdo con la presente invención un serogrupo o un seropatógrupo es un grupo de bacterias que contienen un antígeno común.

45 Aunque una STEC puede pertenecer a uno de varios serogrupos, aquellos más firmemente asociados con enfermedades humanas graves, tales como cepas de EHEC, generalmente pertenecen a los serogrupos O157:[H7], O111:[H8], O26:[H11], EHEC O103:[H2], O145:[H28] (EFSA, 2007). Los genes que se corresponden con estos serogrupos son *rfbE* (O157), *wbd1* (O111), *wzx* (O26), *ihp1* (O145) y *wzx* (O103).

50 Es posible analizar la presencia de uno o más de los antígenos que definen estos serogrupos en una cepa y por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el proceso de acuerdo con este segundo aspecto de la presente invención además comprende poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- *rfbE* (O157);
- *wbd1* (O111);
- *wzx* (O26);
- *ihp1* (O145);

5 - *wzx* (O103).

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención el serotipo se determina mediante un método que comprende las etapas de:

Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- 10 - *rfbE* (O157) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
- *wbd1* (O111) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 35, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
- 15 - *wzw* (O26) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
- *ihp1* (O145) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
- *wzx* (O103) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
- 20 y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana.

En particular estas reacciones podrían ser reacciones de PCR en tiempo real, en cuyo caso se podrían detectar sondas para los productos de amplificación de cada uno, *rfbE* (O157), *wbd1* (O111), *wzw* (O26), *ihp1* (O145) y *wzx* (O103) utilizando las sondas definidas por SEQ ID NO: 33 para *rfbE* (O157), SEQ ID NO: 36 para *wbd1* (O111), SEQ ID NO: 39 para *wzw* (O26), SEQ ID NO: 42 para *ihp1* (O145) y SEQ ID NO: 45 para *wzx* (O103).

25 También es posible detectar otros serotipos tales como O118:[H16], O121:[H19], O5:[HNM], O55:[H7], O123:[H11], O172:[H25], O165:[H25], O157:[H<sub>NM</sub>], O103:[H25], O5:[H<sub>NM</sub>], O118:[H16/H<sub>NM</sub>], O15:[H2] y O45:[H2] y la detección de uno o más de estos serotipos también se incluye en la presente Solicitud de Patente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención el serotipo se determina mediante un método que comprende las etapas de:

- 30 Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:
- *wzx* (O121), utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 67 o SEQ ID NO: 68, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
- 35 - *wzy* (O118), utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
- *wzx* (O45), utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 73 o SEQ ID NO: 74, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
- *wbgN* (O55), utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
- 40 y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana.

En particular estas reacciones podrían ser reacciones de PCR en tiempo real, en cuyo caso se podrían detectar sondas para los productos de amplificación de cada uno de ellos, *wzx* (O121); *wzy* (O118); *wzx* (O45); *wbgN* (O55), utilizando sondas definidas por SEQ ID NO: 69 para *wzx* (O121), SEQ ID NO: 72 para *wzx* (O118), SEQ ID NO: 75 para *wzx* (O45), SEQ ID NO: 78 para *wbgN* (O55).

45 Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida de este segundo aspecto de la presente invención se proporciona un ensayo que comprende las etapas:

a) Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- *stx1*;
- *stx2*;
- 5 - *eae*;
- *espK*;
- *nleB* o *ent/espL2*;
- *rfbE* (O157);

10 y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana; y si los productos de amplificación se detectan entonces:

b) Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con uno o más pares de cebadores derivados de los siguientes genes diana y/o subtipo de *eae*:

- *eae*  $\gamma$ ;
- *eae*  $\beta$ ;
- 15 - *eae*  $\theta$ ;
- *eae* $\epsilon$ ;
- *wbd1* (O111);
- *wzx* (O26);
- *ihp1* (O145);
- 20 - *wzx* (O103).

Ahora se describirá, a modo de ejemplo, un modo específico contemplado por los inventores. En la siguiente descripción se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa. Sin embargo, para un experto en la técnica será evidente que la presente invención puede practicarse sin limitación a estos detalles específicos. En otros ejemplos, no se han descrito métodos y estructuras bien conocidos para no obscurecer innecesariamente la descripción.

### Ejemplos

Ejemplo 1 materiales y métodos

Principio de la matriz GeneDisc

30 El principio de la matriz GeneDisc (GeneSystems, Bruz, Francia) se ha declarado previamente (Beutin et al. 2009). Se basa en aplicaciones de PCR en tiempo real de múltiples dianas en una bandeja de reacción de plástico grabada con microcámaras de reacción precargadas con cebadores de PCR desecados y sondas TaqMan® marcadas o con la etiqueta fluorescente reportera 6-FAM (490 – 520 nm) o ROX (580 – 620 nm).

Propiedades de la matriz GeneDisc desarrolladas en este estudio

35 El "virulotipado por GeneDisc" se ha planificado para el análisis simultáneo de seis muestras diferentes, cada una se analiza para diez genes diana específicos de EHEC, y junto con controles negativos y de inhibición. Tiene las siguientes configuraciones: micropocillo 1) control negativo de PCR (etiqueta 6-FAM) y control de inhibición de PCR (etiqueta ROX), micropocillo 2) *stx2* (FAM) y *stx1* (ROX), micropocillo 3) *ent/espL2* (FAM) y *nleF* (ROX), micropocillo 4) *nleB* (FAM) y *nleH1-2* (ROX), micropocillo 5) *nleE* (FAM) y *nleA* (ROX), y micropocillo 6) *ehxA* (FAM) y *eae* (ROX).

40 Para experimentos adicionales sobre la detección del subtipo de *eae* y la detección del serotipo se utilizaron las siguientes configuraciones en el experimento 1: micropocillo 1) O157 (FAM) y *stx1* + *stx2* (ROX); micropocillo 2) *nleB* (FAM) y *eae* (ROX); micropocillo 3) control negativo (FAM) y control de inhibición (ROX). En el experimento 2: micropocillo 1) *eaey* (FAM) y O113 (ROX); micropocillo 2) O26 (FAM) y O111 (ROX); micropocillo 3) O145 (FAM) y *eae* $\beta$  (ROX); micropocillo 4) *eae* $\theta$  (FAM) y *eae* $\epsilon$  (ROX); micropocillo 5) control negativo (FAM) y control de inhibición (ROX).

Los cebadores de oligonucleótidos y las sondas de genes utilizadas en el GeneDisc se describen en la tabla 1. Los cebadores y las sondas utilizadas para detectar *stx1*, *stx2*, *eae* y *ehxA* se describieron previamente (Nielsen y Andersen 2003, Perelle et al. 2004) y se evaluaron en un estudio reciente en el “Cribado de VTEC” en GeneDisc (Beutin et al. 2009). Todos los oligonucleótidos se compraron de Sigma – Aldrich (St. Quentin Fallavier, Francia). GeneSystems (Bruz, Francia) llevó a cabo la realización de los puntos sonda y la fabricación del GeneDisc.

En la tabla 1 la secuencia de oligonucleótidos Y es (C, T), S es (C, G), W es (A, T), R es (A, G), M es (A, C). K es (G, T); H es (A, T, C); y D es (G, A, T); FAM = 6- carboxilfluoresceína; ROX = carboxi-X-rodamina; sonda = o FAM o ROX; BHQ = Inhibidor de fluorescencia Agujero Negro. \* cadena complementaria; a: gen que codifica la toxina Shiga 1; b: gen que codifica la toxina Shiga 2; c: gen que codifica la intimina; d: gen que codifica la enterohemolisina; e: gen que codifica el “efector ent/espL2 no-LEE putativo”; f: gen que codifica el “efector B no-LEE putativo”; g: gen que codifica el “efector E no-LEE putativo”; h: gen que codifica el “efector F no-LEE putativo”; i: gen que codifica el “efector H1-2 no-LEE putativo”; gen que codifica el “efector A no-LEE putativo”.

Cepas bacterianas investigadas con la matriz GeneDisc

Las cepas de *E. coli* y otras *Enterobacteriaceae* que se investigaron por su contenido en genes de virulencia con el “virulotipado por GeneDisc” pertenecían a la colección del Laboratorio Nacional de Referencia para *E. coli* en el Instituto Federal de Evaluación del Riesgo (BfR) en Berlín, Alemania; y de la Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria (AFSSA) en Maisons-Alfort, Francia. Para la evaluación utilizamos cepas de referencia de STEC y “*E. coli* de Adherencia y Borrado” (AEEC) *eae* - positivas que previamente se caracterizaron para sus genotipos *stx* y *eae* (Beutin et al. 2007, Kozub – Witkowski et al. 2008). Para cepas de referencia de EHEC con grupos O O26, O103, O111, O145 y O157 utilizamos cepas previamente identificadas mediante serotipado de sus antígenos O y H y mediante genotipado de *fliC* (Beutin et al. 2004). Las características y el origen de las cepas de referencia EHEC H19 (O26:H11), PMK5 (O103:H2), CL37 (O111:[H8]), CB7874 (O145:[H28]) y EDL933 (O157:H7) que sirvieron como referencia se habían descrito en otras publicaciones (Beutin et al. 2004, Oswald et al. 2000, Tarr y Whittam 2002). La cepa de referencia de STEC EDL933 (O157:H7) y la cepa de EPEC E2348/69 (O127:H6) se utilizaron como controles positivos para analizar el set completo de genes *nle* p. ej. *ent/espL2* (Z4326), *nleB* (Z4328), *nleE* (Z4329), *nleF* (Z6020), *nleH1-2* (Z6021) y *nleA* (Z6024). La cepa C600 (*E. coli* K-12) se tomó como control negativo para todos los genes investigados en este trabajo (Beutin et al. 2007). Además, 68 cepas de enterobacteriaceae (*C. sakasaki*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Kebsiella*, *Proteus*), caracterizadas mediante métodos estándar (Ewing 1986), se utilizaron para la evaluación de la matriz GeneDisc. Todos los otros aislados de *Enterobacteriaceae* excepto *S. dysenteriae* tipo 1 (*stx1*), la cepa CB7888 de *S. sonnei* (*stx1*) (Beutin et al. 2007) y la cepa 10835 de *Citrobacter rodentium* (*eae*), fueron negativos para los genes *stx* y *eae*. Para el examen, las bacterias se cultivaron en colonias individuales en placas de cultivo de caldo Lauria y crecieron a 37°C durante la noche. Se extrajo el ADN de una pequeña alícuota de la colonia que corresponde a aproximadamente  $2 \times 10^6$  bacterias utilizando la matriz InstaGene (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, Francia) o directamente se disolvió en 200 µl de agua estéril y se agitó en vórtice concienzudamente. Se analizaron mediante la matriz GeneDisc 36 µl de las bacterias resuspendidas o de los extractos de ADN.

## Ejemplo 2. Resultados

Asociación de tipos de *eae*, gen *ehxA* y genes *nle* con cepas de EHEC típicas y atípicas:

Se investigaron con la matriz de virulotipado GeneDisc 250 cepas de EHEC incluyendo EHEC típicas (n = 178), EHEC atípicas (n = 26), y nuevas cepas EHEC emergentes (n = 46) así como cepas *stx* – negativas que pertenecen al mismo serotipo que cepas de EHEC (n = 65) (Tablas 2, 3 y 4). Todas las cepas de EHEC dieron positivo en el análisis para los genes o *stx1* y/o *stx2* en total concordancia con los datos previamente publicados (Beutin et al. 2004, Beutin et al. 2007, Fach et al. 2001, Perelle et al. 2004). Los genes *eae* se detectaron en las cepas que pertenecen a los grupos de EHEC clásicos O26, O103, O111, O145 y O157 así como en cepas emergentes de EHEC tipo O5, O15, O45, O55, O118, O121, O123, O165, y O172. Únicamente una cepa de EHEC O103:H2 dio negativo en el análisis con los genes *eae* (Tabla 2).

Los genes *eae* estaban ausentes en todas las otras STEC investigadas, incluidas las EHEC atípicas O91:H21 y O113:H21, estas últimas se aíslan frecuentemente de alimentos y de pacientes humanos (Werber et al. 2008). Notablemente, todas las STEC *eae* – negativas así como las cepas de EHEC atípicas también fueron negativas para el set de genes *nle* investigados en este estudio (Tabla 4).

En la tabla 4, se utilizan las siguientes abreviaciones: EHEC es *E. coli* enterohemorrágica; STEC es *E. coli* productora de toxina Shiga; ETEC es *E. coli* enterotoxigénica; FEC es *E. coli* aislada de heces de niños sanos, EC es *E. coli*.

Los genes *nle* codificados en las islas OI#71 y OI#122 se presentaron en cepas de EHEC típicas incluidos los nuevos serotipos emergentes. Se encontró un patrón característico de los genes *nle* (*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleF*, *nleH1-2* y *nleA*) en cepas de EHEC que pertenecen a los serotipos O157:[H7], O111:[H8], O26:[H11], O103:[H25], O118:[H16], O121:[H19], O5:HNM, O55:H7, O123:H11, O172:H25, y O165:H25 (Tabla 2). Entre las 76 cepas de EHEC O157:[H7], seis eran cepas *stx2* fermentadoras de sorbitol (SF) O157:H<sub>NM</sub>, éstas mostraron el mismo patrón

*nle* que las cepas no – SF O157:[H7]. Dos cepas O-rough:[H7] (*stx2*, *eae*-gamma), previamente identificadas como positivas para el gen *rfbE*<sub>O157</sub> tuvieron el mismo patrón *nle* que las cepas clasificables serológicamente O157:[H7].

Se encontró otro tipo de patrón *nle* en las cepas de EHEC que pertenecen a las cepas de serotipos O103:H2, O145:[H28], O45:H2, y O15:H2. Éstas fueron positivas para todos los genes *nle* investigados excepto para los genes *nleA* y *nleF* codificados en OI#71 (Tabla 2). Nuestros resultados indican que las cepas de EHEC típicas están altamente conservadas para la distribución de genes *nle* y apuntan hacia una asociación del genotipo *eae*, el patrón *nle* y el serotipo. Raramente se observaron excepciones, tales como la ausencia del gen *nleH1-2* en una de las 34 cepas de EHEC O26:H11 examinadas (Tabla 2). La mayoría (93,25%) de las cepas de EHEC típicas fueron positivas para el gen *ehxA* que codifica enterohemolisina localizado en un plásmido, este marcador también se presentó en el 87% de las nuevas EHEC emergentes, en el 73% de las EHEC atípicas y en el 42,66% de otras cepas STEC investigadas en este estudio.

Identificación y caracterización del serotipo y otras propiedades de cepas *stx* - negativas que se parecen a EHEC:

Previamente se declaró que las cepas EHEC pueden perder espontáneamente su gen *stx* durante la infección y tras el subcultivo (Friedrich et al. 2007). Nos interesamos en investigar la similitud entre cepas de *E. coli stx* – negativas, *eae* – positivas que pertenecen a serotipos asociados a EHEC y cepas EHEC con respecto a sus genotipos *eae* y sus genes *nle*. Los resultados obtenidos con 65 cepas se presentan en la tabla 3. Los inventores pudieron identificar tres cepas O157:[H7] *stx* – negativas, diez cepas O26:[H11], una cepa O103:[H2], tres cepas O121:[H19], una cepa O121:[H-], cuatro cepas O55:H7 y una cepa O15:H2 que mostraron genotipos *eae* y patrones *nle* similares a EHEC productoras *stx* que pertenecen a los mismos serotipos (Tabla 3).

Parece probable que estas cepas representen remanentes de cepas de EHEC pertenecientes a estos serotipos que han perdido sus genes *stx*. Por el contrario, un grupo de catorce cepas O157 con flagelos no-H7 (H<sub>NT</sub>, H16, H2, H26, H27, H39, H45) se diferenció de EHEC O157:H7 no únicamente por sus tipos H sino que también por sus genotipos *eae* y la ausencia de la mayoría de genes *nle* investigados, excepto *nleH1-2* y *nleA*.

Las cepas de EHEC O111:[H8] habitualmente fueron positivas para *eae*-theta y para todos los genes *nle* codificados en OI#71 y OI#122. Únicamente una de 24 cepas fue negativa para *nleF* (Tabla 2). Dos cepas individuales O111:H11 *stx* – negativas (*eae*-beta) mostraron el mismo perfil *nle* que EHEC O111:[H8] lo que indica que la transferencia de islas de patogenicidad pudo ocurrir entre diferentes patogrupos de *E. coli*. Curiosamente, se encontró que las cepas de EPEC O111:H2 que causan gastroenteritis en niños eran diferentes de EHEC O111:[H8], por su tipo H, y por la ausencia de genes *nleA* y *nleF* codificados en OI#71 (Tabla 3). Una cepa de EPEC O111:H19 (*eae*-eta) estaba aún más distante de EHEC O111:[H8] ya que no llevaba ninguno de los genes *nle*.

Las cepas de EHEC O154:[H28] se caracterizan por la posesión del set completo de genes *nle* codificados en el módulo 2 de OI#122 *ent*, *nleB* y *nleE* (Tabla 2). Curiosamente, estos genes estaban ausentes en dos cepas O145:[H28] *stx* – negativas que se parecían a EHEC O145:[H28] en todos los otros rasgos que se investigaron (Tabla 3). Es posible que estas cepas sean remanentes de EHEC O145:[H28] que han perdido sus genes *stx* y la PAI OI#122. Todas las cepas de EPEC O145 (O145:H34, O145:H4 y O145:Hr) diferían significativamente de EHEC O145:[H28] ya que no poseían ningún gen *nle* y codificaban otros genotipos *eae*.

En el grupo de cepas O103:H2, la cepa de EPEC de conejo E22 era similar a todas las cepas EHEC O103:H2 para el set de genes *nle* pero difería en el subtipo *eae*-beta, ya que EHEC O103:H2 codifica *eae*-epsilon. Por el contrario, se encontró que la cepa EHEC O103:H25, que causó un brote de HUS en Noruega en 2006 (Schimmer et al. 2008), difería del clon clásico de EHEC O103:H2 por su tipo H, su tipo *eae* y por su set de genes *nle*.

Adicionalmente investigamos representantes de grupos de EPEC clásicas. La cepa EPEC O55:H7 era similar a las cepas EHEC O157:[H7] en su genotipo *eae* y genes *nle*. Todos los genes *nle* investigados también se presentaron en EPEC O127:H6, cepa E2348/69. EPEC O84:H2 albergaba todos los genes *nle* excepto *nleE*. EPEC O156:H8 fue negativa únicamente para los genes *nleF* y *nleA* de OI#71. EPEC O128:H2 y O113:H6 fueron positivas únicamente para *nleH* y carecían de los genes *nle* asociados al módulo 2 de OI#122. EPEC O55:H6 también carecía de los genes *nle* asociados al módulo 2 de OI#122 pero llevaba *nleH* y *nleF*. Por el contrario EPEC O86:H40 llevaba los genes *nle* codificados en el módulo 2 de OI#122 pero ninguno de aquellos localizados en OI#71 (Tabla 3). Algunas otras cepas de EPEC (O125:H6, O126:H6, O51, y O76:H51) no poseían ningún gen *nle* y habitualmente codificaban el genotipo *eae*-alpha. Estos descubrimientos apuntaban a diferencias significativas entre cepas de EPEC y EHEC, no únicamente para sus serotipos, sino también para sus efectores asociados y no asociados a LEE.

Identificación y caracterización de cepas *eae* - y *nle* – negativas

Se aíslan numerosos tipos de STEC de animales y alimentos pero únicamente el 5% de ellas son positivas para un gen *eae* o pertenecen a los serogrupos de EHEC típicos O26, O103, O111, O145 y O157 (Beutin et al. 2007). Se conoce que algunas de las cepas de STEC *eae* – negativas causan diarrea en humanos pero raramente se involucran en enfermedades hemorrágicas tales como HC y HUS (Beutin et al. 2004, Friedrich et al. 2007, Werber et al. 2008). Nos interesamos en investigar cepas representativas de tipos de STEC *eae* – negativas que se aíslan frecuentemente de alimentos (O8, O91, O100, O113, O146, O128 y O174). Se investigaron con el virulotipado GeneDisc un total de 150 cepas de STEC que se aislaron de alimentos, animales y humanos así como 29 aislados

de *E. coli* fecal de niños sanos (FEC). Los resultados se resumen en la tabla 4. Ninguna de las cepas de STEC *eae* -negativas o de las FEC de niños sanos fue positiva para ninguno de los genes *nle*, lo que apunta a una asociación estrecha entre la presencia de los genes *nle* codificados en LEE y OI#122 y OI#71.

5 Para examinar la posible expansión de los genes *nle* codificados en OI#122 y OI#71 hacia otras *Enterobacteriaceae* investigamos 68 cepas de bacteria que comprenden especies de *Escherichia*, *Cronobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Kebsiella* y *Proteus*. Excepto por las dos cepas de *S. dysenteriae* tipo 1 (*stx1*), la cepa *S. sonnei* CB7888 (*stx1*) y la cepa de *Citrobacter rodentium* CB10835 (*eae*, *nleE*, *nleA*) (datos no mostrados), todos los otros aislados de *Enterobacteriaceae* se confirmaron como negativos para los genes *stx1* y/o *stx2*, *eae*, *ehxA* y para los genes *nle* (Tabla 4). En resumen, estos resultados muestran que la matriz de virulotipado que combina la  
10 detección de los genes *nle* en asociación con los genotipos de *stx* y *eae* es una herramienta apropiada para una identificación rápida de cepas de EHEC humanas virulentas, que pertenecen a serotipos conocidos y nuevos emergentes, en muestras que pueden contener otras STEC, EPEC, otras *Enterobacteriaceae* y *E. coli* de la flora fecal humana.

15 Una estrategia de evaluación del riesgo molecular para cribar EHEC en matrices complejas basada en un análisis polifacético del subtipo de *eae* y del serotipo:

Como se explica anteriormente, las EHEC son un grupo importante, existente y emergente, de patógenos transmitidos por los alimentos que representan una seria amenaza para la seguridad alimentaria. No se conoce ningún marcador genético individual cuya detección indique la presencia de EHEC en una muestra polimicrobiana compleja (p. ej. muestras alimentarias o fecales) de una manera similar a ensayos para otros contaminantes  
20 microbianos comunes de alimentos tales como *Salmonella spp.* Consecuentemente, la detección rápida y simultánea de varios marcadores genéticos en un ensayo multiparamétrico es la estrategia más apropiada para el cribado rápido de muestras, como una manera de llevar a cabo una evaluación del riesgo molecular, que a su vez permite los recursos necesarios para estudios adicionales de la cepa sospechosa, por ejemplo mediante el cultivo enriquecido del serotipo específico.

25 Los inventores han desarrollado un primer ensayo, expuesto anteriormente, basado en la detección de un mínimo complemento de genes, que es indicativo de que una cepa de STEC también puede ser una cepa de EHEC.

Este ensayo se puede elaborar adicionalmente determinando también el subtipo del gen *eae* presente en la muestra.

Los inventores han establecido que cuando se detectan los genes *stx1/2*, *eae* y al menos uno de los genes *nle* (*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleH1-2*) y cuando en una segunda etapa se detectan también uno de los subtipos *eae* específicos, *eae-γ*, *eae-β*, *eae-ε* y *eae-θ*; esto también puede utilizarse para predecir el serotipo de la cepa de EHEC (esto por supuesto se puede verificar adicionalmente detectando la presencia del gen subyacente al serotipo).  
30

Estas correlaciones entre el subtipo *eae* y el serotipo son las siguientes:

- Se sospechan EHEC O157:H7 y O145:H28 en particular, cuando se detectan *eae-γ*, *ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, y *nleH1-2*.
- 35 - Se sospecha EHEC O103:H2 en particular, cuando se detectan *eae-ε*, *ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, y *nleH1-2*.
- Se sospecha EHEC O26:H11 en particular, cuando se detectan *eae-β*, *ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, y *nleH1-2*.
- Se sospecha EHEC O111 es H11 en particular, cuando se detectan *eae-θ*, *ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, y *nleH1-2*.

En una muestra compleja, la sola presencia de genes *nle* no es siempre indicativa de la presencia de una EHEC en esta muestra. Podría resultar, por ejemplo, de la presencia de EPEC o de *Citrobacter rodentium* que también tienen genes *nle*. En comparación, la detección simultánea de los genes *stx* (*stx1*, *stx2*), *eae* (en particular los subtipos  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$ ) junto con al menos uno de los genes *nle* (*ent/espL2*, *nleB*, *nleE*, *nleH1-2*) es una firma mucho más clara de virulencia y una señal fuerte de contaminación por EHEC.  
40

Los inventores también han desarrollado un proceso adicional de dos etapas para determinar el riesgo que presenta cualquier *E. coli* spp. presente en una muestra y en particular para determinar si la muestra comprende una cepa EHEC.  
45

En una primera etapa, se determina la presencia de los genes *stx1/2* y *eae* así como al menos de uno de los *ent/espL2*, *NleB*, *NleE* y *NleH1-2*. Esta primera etapa puede llevarse a cabo utilizando los oligonucleótidos descritos a continuación en la Tabla 1.

Esta primera etapa permite a un trabajador determinar si la muestra comprende al menos los genes esenciales para una cepa de EHEC. Si uno o más de estos genes no están presentes se puede considerar que la muestra presenta un riesgo bajo y por lo tanto no necesita estudiarse más.  
50

Si todos los genes están presentes, la muestra presenta un riesgo y entonces se lleva a cabo una segunda etapa en la cual también se determina al menos el subtipo de eae (tales como eae- $\gamma$ , eae- $\beta$ , eae- $\epsilon$  y eae- $\epsilon$ ) y la presencia de uno o más genes de serotipo (tales como serotipos O157, O103, O26, O111, O145).

5 Con este set de datos combinados, un trabajador puede determinar si la muestra comprende potencialmente una cepa de EHEC y por lo tanto necesita apartarse de la cadena de suministro (en el caso de una muestra alimentaria) y/o retenerse para estudios adicionales.

En base a la invención, las siguientes estrategias multiparamétricas permiten el cribado fiable de EHEC en muestras complejas.

Las correlaciones que los inventores han encontrado se resumen a continuación en las tablas 2 y 5.

10 Los inventores también han analizado varios otros serotipos de cepas de EHEC emergentes (46 cepas en total), que se observan con menos frecuencia, y han encontrado correlaciones adicionales entre el subtipo eae y los complementos de gen *nle* con estos otros serotipos, ver tablas 2 y 6.

De acuerdo con este aspecto de la invención los inventores proporcionan un proceso de dos etapas como sigue:

15 a) poner en contacto la muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- *stx1*;

- *stx2*;

- *eae*;

- *nleB* o *ent/espL2*;

20 - *rfbE* (O157);

y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de los genes diana; y si se detectan los productos de amplificación entonces:

b) poner en contacto la muestra o el ADN aislado de la misma con uno o más pares de cebadores derivados de los siguientes genes diana y/o subtipo eae:

25 - eae  $\gamma$ ;

- eae  $\beta$ ;

- eae  $\theta$ ;

- eae  $\epsilon$ ;

- *wbd1* (O111);

30 - *wzx* (O26);

- *ihp1* (O145);

- *wzx* (O103);

y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación de cada uno de los genes diana.

35 Los datos de este ensayo pueden compararse con las correlaciones entre el subtipo eae y el serotipo, en una cepa que también comprende los genes esenciales de virulencia (p. ej. *stx1/2*, eae y *nleB* o *ent/espL2*) y puede tomarse una decisión informada y reproducible sobre el riesgo que plantea la muestra.

La presencia de marcadores genéticos asociados a EHEC y EPEC en cepas de *E. coli* y la asociación con alelos de *nleB*

40 Un set de cepas de *E. coli*, todas caracterizadas como *stx* - negativas y *eae* - positivas, se analizaron adicionalmente para la presencia de los genes *espK* y *nleB* y se compararon con un número de cepas de EHEC que eran *stx* - positivas y *eae* - positivas.

Se encontró que el gen *nleB* era diverso y que existen diferentes alelos. Por lo tanto, los inventores seleccionaron dos sets de cebadores y sondas, que identifican dos alelos diferentes de *nleB* que se encontraron desigualmente distribuidos en las cepas de EPEC y EHEC (Tabla 7).

Notablemente, todas las cepas de EHEC dieron positivo para ambos genotipos *nleB* y *nleB2* así como para *espK*. Únicamente muy pocas cepas de EPEC, que difieren claramente en sus serogrupos de las cepas de EHEC típicas, albergan el set completo de marcadores genéticos [*nleB*, *nleB2* y *espK*].

5 Las otras cepas de EPEC, que se dividen en varios grupos basados en su genotipo *nleB* y la presencia del gen *espK*, nunca fueron positivas para el set completo [*nleB*, *nleB2* y *espK*].

10 Curiosamente, algunas cepas de EPEC carecen de la secuencia del gen *nleB2* o tenían una secuencia *nleB2* significativamente diferente, de modo que no se detectaron con el análisis de PCR específico para *nleB2*. También, algunas cepas de EPEC dieron una señal muy débil con el análisis de PCR de *nleB2*, lo que indica la presencia en estas cepas de una variante en la secuencia del gen *nleB2*. (En relación con el alto valor Ct generado con el análisis de PCR descrito en la invención con algunas cepas de EPEC, tales cepas se reflejaron como *nleB2* – negativas en la tabla 7).

15 De acuerdo con la presente invención el Ct (umbral de ciclo) se define como el número de ciclos que se requieren para que la señal fluorescente atraviese el umbral (p. ej. exceda el nivel de fondo). Los niveles Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra (p. ej. cuanto menor sea el nivel Ct, mayor es la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra y/o a la inversa, el alto valor Ct generado con el análisis de PCR descrito en la invención con algunas cepas EPEC indica o una baja cantidad de ADN diana o una fase de replicación ineficiente en la reacción de PCR).

20 Como una consecuencia de lo anterior, la detección de la secuencia del gen *nleB2* fue restringida principalmente a EHEC O157, O145, O103, O111, O26 y O121. Por lo tanto, la detección de esta secuencia específica en una cepa o en una muestra polimicrobiana se correlaciona con la presencia de EHEC del top 5 y con un número limitado de cepas de EPEC (ver tabla 7).

25 La detección de las secuencias de los genes *nleB2* y *espK* en la misma cepa de *E. coli* o en la misma muestra refuerza el valor predictivo de EHEC (ver Tabla 7). La restricción de estas dos secuencias a EHEC y a un número muy limitado de cepas no-EHEC es de un gran valor como parte de una evaluación del riesgo molecular de cepas de EHEC.

30 Cuando se detectan por si mismos los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *nleB* y *espK* no son suficiente para predecir la presencia de EHEC en una muestra polimicrobiana compleja (p. ej. muestras alimentarias o fecales). En muestras alimentarias (tales como productos lácticos y carne de res) la detección de uno de estos genes tomada individualmente no es suficiente para sospechar que una muestra está contaminada por una cepa de EHEC. Esto es porque un número de alimentos, que no están contaminados por EHEC, llevan una o más *E. coli* spp. que comprenden al menos uno de estos genes, por lo tanto no pueden utilizarse por si mismos como un marcador selectivo par la detección de una EHEC. Sin embargo, cuando todos estos genes se detectan o se asocian en la misma muestra, pueden utilizarse como una firma de virulencia como se demuestra mediante los datos presentados en la presente memoria.

35 También en base a los datos presentados en la Tabla 7, para mejorar adicionalmente los métodos de evaluación del riesgo molecular, la detección del gen *eae* puede reemplazarse o suplementarse ventajosamente con la detección del gen *espK*. Además, la detección del gen *nleB* podría detectarse ventajosamente en base a la secuencia *nleB2*. De acuerdo con la presente invención, estas ambas elaboraciones de la evaluación del riesgo molecular aumentan el nivel de información proporcionado mediante la evaluación y por lo tanto permiten una evaluación más robusta del riesgo asociado a una muestra.

40



Tabla 1. Cebadores y sondas pre cargados en el GeneDisc.

| Secuencia del gen diana      | Secuencias de cebador directo, cebador reverso y sonda (5' – 3')  | Localización dentro de la secuencia                         | Número de accesoión de GenBank | Referencias               |
|------------------------------|---|---|--------------------------------|---------------------------|
| <i>stx1<sup>a</sup></i>      | TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG<br>CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC *<br>ROX- CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A -BHQ | 878 – 906<br>983 – 1008<br>941 – 971                        | M16625                         | (Perelle et al. 2004)     |
| <i>stx2<sup>b</sup></i>      | TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTAC G<br>CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC *<br>FAM- TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC -BHQ       | 785 – 813<br>887 – 912<br>838 – 864                         | X07865                         | (Perelle et al. 2004)     |
| <i>eae<sup>c</sup></i>       | CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA<br>CTC ATG CCG AAA TAG CCG TTA *<br>ROX- AT AGT CTC GCC AGT ATT CGC CAC CAA TAC -BHQ *             | 899 – 924<br>979 – 1000<br>936 – 966                        | Z11541                         | (Nielsen y Andersen 2003) |
| <i>ehxA<sup>d</sup></i>      | GTG TCA GTA GGG AAG CGA ACA<br>ATC ATG TTT TCC GCC AAT G *<br>FAM- CGT GAT TTT GAA TTC AGA ACC GGT GG -BHQ                            | 41832 – 41852<br>41939 – 41957<br>41868 – 41893             | AF074613                       | Este estudio              |
| <i>ent/espL2<sup>e</sup></i> | TCC TGG ATT ATT TTC TGC ATT TCA<br>ACT ATT GCC AAG TAC GCC ACA A *<br>FAM- AAT GGT CAT GCA GAC GCA ATA AAG GCA TA -BHQ                | 3929758 – 3929781<br>3929833 – 3929812<br>3929783 – 3929811 | AE005174                       | Este estudio              |
| <i>nleB<sup>f</sup></i>      | CAT GTT GAA GGC TGG AAS TTT GT<br>CCG CTA CAG GGC GAT ATG TT *<br>FAM- ACA GAG ACG GGA AAA ACT GGA TGC CA -BHQ                        | 3931502 – 3931524<br>3931573 – 3931554<br>3931527 – 3931552 | AE005174                       | Este estudio              |
| <i>nleE<sup>g</sup></i>      | AGA AGC GTT TGA ACC TAT TTC CA<br>TTG GGC GTT TTC CGG ATA T *<br>FAM- AGC CAG TAC ACC GGA AGG AAG CTG G -BHQ                          | 3932207 – 3932229<br>3932289 – 3932271<br>3932237 – 3932261 | AE005174                       | Este estudio              |

|                             |   |   |          |              |
|-----------------------------|---|---|----------|--------------|
| <i>nleF</i> <sup>1</sup>    | TGA GGT GAG AAA TGA AAA TAC TGA TG *<br>CTA TCC CTG TCC TCT ATC GTC ATTC<br>ROX- TGT CGG AGC GCT GAG GGC G -BHQ*                  | 2281256 – 2281231<br>2281182 – 2281206<br>2281226 – 2281208 | AE005174 | Este estudio |
| <i>nleH</i> <sup>1-2'</sup> | ACA AGA GAA AGT CAT AGT GGT TG<br>AAT CTC YCC CTT AGG CCA TCC CA *<br>ROX- TTT ACT AAT CTG TTG CAC AGG -BHQ                       | 2282298 – 2282276<br>2282230 – 2282252<br>2282274 – 2282254 | AE005174 | Este estudio |
| <i>nleA</i> <sup>1</sup>    | AGA TAA CYC TAA TAC TAA ATA TGC C<br>GCC CAA CCA TTG CRC CGA TAT GAG G *<br>ROX- TTC TTA CCA ATG CTG CCG CAA ATG CGC -BHQ         | 2285138 – 2285162<br>2285274 – 2285250<br>2285164 – 2285190 | AE005174 | Este estudio |
| <i>rfbE</i> (O157)          | TTT CAC ACR RAR RGG ATG GTC TCA A<br>CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT<br>Sonda- AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG            | 348 – 372<br>412 – 435<br>381 – 410                         | AF163329 | Este estudio |
| <i>wbd1</i> (O111)          | CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GCT TT<br>TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAT CTT GTT TAG C<br>Sonda- TTG AAT CTC CCA GAT GAT CAA CAT CGT GAA | 3464 – 3489<br>3579 – 3609<br>3519 – 3548                   | AF078736 | Este estudio |
| <i>wzw</i> (O26)            | CGC GAC GGC AGC GAA AAT T<br>AGC AGG CTT TTA TAT TCT CCA ACT TT<br>Sonda- CCC CGT TAA ATC AAT ACT ATT TCA CGA GGT TGA             | 5648 – 5666<br>5757 – 5782<br>5692 – 5724                   | AF529080 | Este estudio |
| <i>lhp1</i> (O145)          | CGA TAA TAT TTA CCC CAC CAG TAC AG<br>GCC GCC GCA ATG CTT<br>Sonda- CCG CCA TTC AGA ATG CAC ACA ATA TCG                           | 1383 – 1408<br>1500 – 1514<br>1472 – 1498                   | AF531429 | Este estudio |
| <i>wzx</i> (O103)           | CAA GGT GAT TAC GAA AAT GCA TGT<br>GAA AAA AGC ACC CCC GTA CTT AT<br>Sonda- CAT AGC CTG TTG TTT TAT                               | 4299 – 4323<br>4397 – 4375<br>4356 – 4373                   | AY532664 | Este estudio |

|                   |   |   |          |                                 |
|-------------------|---|---|----------|---------------------------------|
| <i>wzx</i> (O121) | TGG TCT CTT AGA CTT AGG GC<br>TTA GCA ATT TTC TGT AGT CCA GC<br>Sonda- TCC AAC AAT TGG TCG TGA AAC AGC TCG                  | 6849 – 6868<br>6924 – 6946<br>6873 – 6899 | AY208937 | Este estudio                    |
| <i>wzy</i> (O118) | ATA TTT GCA CGA TTT ACA GAT GT<br>AAA ATA TGA AGC AAA ATA ACA GCC<br>Sonda- ATA TTA TTG ATA CCA GTA ATA CTT AAA ATC TCT TCC | 4396 – 4418<br>4500 – 4523<br>4435 – 4470 | DQ990684 | Este estudio                    |
| <i>wzx</i> (O45)  | TAC GTC TGG CTG CAG GG<br>ACT TGC AGC AAA AAA TCC CC<br>Sonda- TTC GTT GCG TTG TGC ATG GTG GC                               | 7445 – 7461<br>7490 – 7509<br>7465 – 7487 | AY771223 | Este estudio                    |
| <i>wbgN</i> (O55) | TGT AAT TCG ATG CAC CAA TTC AG<br>CGC TTC GAC GTT CGA TAC ATA A<br>Sonda- TCC GTG CAT ATA CGC CGC GGA                       | 8851 – 8873<br>8899 – 8920<br>8876 – 8896 | AF461121 | Este estudio                    |
| <i>eee α</i>      | GAT ACG AAT GGC TAT GCC AAA G<br>CAT CGC TAA CAC GGG CAC TA<br>Sonda- A ACA TCG ACA ACT CCA GGA AAA TCA CTC GT              | 2459 – 2482<br>2775 – 2554<br>2541 – 2511 | M58154   | (Nielsen<br>y<br>Andersen 2003) |
| <i>eee β</i>      | GGT GAT AAT CAG AGT GCG ACA TAC A<br>GGC ATC AAA ATA CGT AAC TCG AGT AT<br>Sonda- CCA CAG CAA TTA CAA TAC TAC CCG GTG CA    | 3167 – 3191<br>3259 – 3234<br>3227 – 3199 | U600002  | (Nielsen<br>y<br>Andersen 2003) |
| <i>eee γ</i>      | GAC TGT TAG TGC GAC AGT CAG TGA<br>TTG TTG TCA ATT TTC AGT TCA TCA AA<br>Sonda- TGA CCT CAG TCG CTT TAA CCT CAG CC          | 2267 – 2291<br>2350 – 2325<br>2319 – 2294 | Z11541   | (Nielsen<br>y<br>Andersen 2003) |
| <i>eee δ</i>      | CAT TAT CCG GTG AAG AAG TGA CTT T<br>CAT AAC CAC TCT GAT CGG TCG TTA<br>Sonda- CTT TAG TTT TAT CCA ATG CCC CAA AAT CCG      | 98 – 123<br>181 – 158<br>157 – 128        | Y13112   | (Nielsen<br>y<br>Andersen 2003) |

|               |   |   |          |                           |
|---------------|---|---|----------|---------------------------|
| <i>eeε</i>    | ATA CCC AAA TTG TGA AAA CGG ATA<br>CAC TAA CAA CAG CAT TAC CTG CAA<br>Sonda- CCA GAT GTC AGT TTT ACC GTA GCC CTA CCA        | 2528 – 2551<br>2611 – 2588<br>2585 – 2556 | AF116899 | (Nielsen<br>Andersen 2003 |
| <i>eeζ</i>    | GAT GTC AAA GCA CCT GAA GTT GAA<br>CCC TTT GAT TCC AGT TCC TAC AA<br>Sonda- TCT TCA CCC CAC TTG CTA TTG ATG ACG G           | 2224 – 2247<br>2310 – 2288<br>2249 – 2276 | AF449417 | (Nielsen<br>Andersen 2003 |
| <i>eeθ</i>    | TGT TAA AGC ACC TGA GGT TAC ATT TT<br>TCA CCA GTA ACG TTC TTA CCA AGA A<br>Sonda- TCA ACC TTG TTG TCA ATT TTC AGT CCA TCA   | 5776 – 5802<br>5859 – 5835<br>5832 – 5802 | AF025311 | (Nielsen<br>Andersen 2003 |
| <i>riεB-2</i> | TAT YCT CTG GAA CCT ATT GAT GAA AA<br>CCT TTT TCG TAT CGC TCT GGC C<br>TTG CTT CAA ACC ACT GAA AAA GAA TAG GGG              |   |          |                           |
| <i>EspK</i>   | ATT GTA ACT GAT GTT ATT TCG TTT GG<br>GRC ATC AAA AGC GAA ATC ACA CC<br>CAG ATA CTC AAT ATC ACA ATC TTT GAT ATA TAA ACG ACC |   |          |                           |

Tabla 2. Virulotipado de los genes *eae* y *nle* en cepas EHEC

| Serotipo               | Número<br>analizado | <i>ehxA</i> | <i>eae</i> | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>NleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|------------------------|---------------------|-------------|------------|------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| O157:H7,<br>O157:[H7]* | 68 <sup>a,b,c</sup> | <i>ehxA</i> | gamma      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O157:[H7]              | 6 <sup>a,b,c</sup>  | <i>ehxA</i> | gamma      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O157:[H7]              | 2 <sup>a</sup>      | <i>ehxA</i> | gamma      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O103:H2                | 23 <sup>a,b,c</sup> | <i>ehxA</i> | epsilon    | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O103:H2                | 2 <sup>a,c</sup>    | -           | epsilon    | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O103:[H2]              | 1                   | <i>ehxA</i> | -          | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O111:[H8]              | 20 <sup>a,c</sup>   | <i>ehxA</i> | theta      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O111:[H-]              | 2 <sup>a</sup>      | <i>ehxA</i> | theta      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O111:H8                | 1 <sup>a</sup>      | -           | theta      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O111:H8                | 1 <sup>a</sup>      | -           | theta      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:[H11]              | 21 <sup>a,b,c</sup> | <i>ehxA</i> | beta       | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:[H11]              | 7 <sup>a</sup>      | -           | beta       | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:[H11]              | 4 <sup>a,c</sup>    | <i>ehxA</i> | beta       | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:[H11]              | 1 <sup>a</sup>      | -           | beta       | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:H11                | 1 <sup>a</sup>      | <i>ehxA</i> | beta       | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | -              | <i>nleA</i> |
| O145:[H28]             | 17 <sup>a,c</sup>   | <i>ehxA</i> | gamma      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O145:H28               | 1 <sup>a</sup>      | <i>ehxA</i> | gamma      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O5:H-                  | 12 <sup>a,b</sup>   | <i>ehxA</i> | beta       | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O55:H7                 | 2 <sup>a,b</sup>    | -           | gamma      | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O45:H2                 | 1 <sup>a</sup>      | <i>ehxA</i> | epsilon    | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O118:H16               | 19 <sup>a,c</sup>   | <i>ehxA</i> | beta       | ent/espL2        | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |

|            |                |      |         |           |      |      |      |         |      |
|------------|----------------|------|---------|-----------|------|------|------|---------|------|
| O118:H16   | 2 <sup>a</sup> | -    | beta    | ent/espL2 | nleB | nleE | nleF | nleH1-2 | nleA |
| O121:H19   | 4 <sup>a</sup> | ehxA | epsilon | ent/espL2 | nleB | nleE | nleF | nleH1-2 | nleA |
| O123:H11   | 1 <sup>a</sup> | ehxA | beta    | ent/espL2 | nleB | nleE | nleF | nleH1-2 | nleA |
| O165:H25   | 1 <sup>a</sup> | ehxA | epsilon | ent/espL2 | nleB | nleE | nleF | nleH1-2 | nleA |
| O172:[H25] | 1 <sup>a</sup> | ehxA | epsilon | ent/espL2 | nleB | nleE | nleF | nleH1-2 | nleA |
| O15:H2     | 1 <sup>a</sup> | -    | beta    | ent/espL2 | nleB | nleE | -    | nleH1-2 | -    |
| O103:H25   | 1 <sup>a</sup> | ehxA | theta   | ent/espL2 | nleB | nleE | nleF | nleH1-2 | nleA |

\* seis de ellos eran SF O157:NM, y 2 eran O-rough:[H7] positivos para el gen *rfbE<sub>O157</sub>*. [ ]: Genotipado de los genes *flc* o *rfb*. <sup>a</sup>: Aislados clínicos; <sup>b</sup>: aislados alimentarios; <sup>c</sup>: aislados animales / ambientales

Tabla 3. Virulotipado de los genes *eae* y *nle* en cepas *stx* – negativas

| Serotipo   | Número<br>analizado | <i>ehxA</i> | <i>eae</i> | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>NleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|------------|---------------------|-------------|------------|------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| O103:H2    | 1                   | <i>ehxA</i> | epsilon    | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O103:H2    | 1*                  | -           | beta       | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O111:H11   | 2                   | <i>ehxA</i> | beta       | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O111:[H2]  | 2                   | -           | beta       | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O111:NM    | 1                   | -           | beta       | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O111:H19   | 2                   | -           | eta        | -                | -           | -           | -           | -              | -           |
| O111:[H25] | 1                   | -           | theta      | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O145:[H28] | 2                   | <i>ehxA</i> | gamma      | -                | -           | -           | -           | <i>nleH1-2</i> | -           |
| O145:H34   | 1                   | -           | theta      | -                | -           | -           | -           | -              | -           |
| O145:H4    | 1                   | -           | iota       | -                | -           | -           | -           | -              | -           |
| O145:Hr    | 1                   | -           | iota       | -                | -           | -           | -           | -              | -           |
| O26:[H11]  | 7                   | -           | beta       | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:H11    | 2                   | <i>ehxA</i> | beta       | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:[H11]  | 1                   | <i>ehxA</i> | beta       | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:[H11]  | 1                   | -           | beta       | -                | -           | -           | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:[H11]  | 1                   | -           | -          | -                | -           | -           | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O157:H7    | 1**                 | <i>ehxA</i> | gamma      | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O157:[H7]  | 2                   | <i>ehxA</i> | gamma      | <i>ent/espL2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O157:[HNT] | 1                   | -           | beta       | -                | -           | -           | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O157:H16   | 5                   | -           | epsilon    | -                | -           | -           | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O157:H2    | 1                   | -           | tau        | -                | -           | -           | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O157:H26   | 2                   | -           | beta       | -                | -           | -           | -           | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |

|           |      |      |                 |           |      |      |         |      |
|-----------|------|------|-----------------|-----------|------|------|---------|------|
| O157:H27  | 1    | ehxA | no-clasificable | -         | -    | nleE | -       | nleA |
| O157:H39  | 1    | ehxA | kappa           | -         | -    | nleE | -       | nleA |
| O157:H45  | 2    | -    | alpha           | -         | -    | nleF | nleH1-2 | nleA |
| O157:H45  | 1    | -    | alpha           | -         | -    | nleF | nleH1-2 | -    |
| O15:H2    | 1    | -    | beta            | ent/espL2 | nleB | nleE | nleH1-2 | -    |
| O55:H7    | 4    | -    | gamma           | ent/espL2 | nleB | nleE | nleH1-2 | nleA |
| O121:[H-] | 1    | -    | epsilon         | ent/espL2 | nleB | nleE | nleH1-2 | nleA |
| O121:H19  | 3    | ehxA | epsilon         | ent/espL2 | nleB | nleE | nleH1-2 | nleA |
| O121:H19  | 1    | ehxA | -               | ent/espL2 | nleB | nleE | nleH1-2 | nleA |
| O55:H6    | 1    | -    | iota            | -         | -    | nleF | nleH1-2 | -    |
| O128:H2   | 1    | -    | beta            | -         | -    | -    | nleH1-2 | -    |
| O113:H6   | 1    | -    | beta            | -         | -    | -    | nleH1-2 | -    |
| O127:H6   | 1*** | -    | alpha           | ent/espL2 | nleB | nleE | nleH1-2 | nleA |
| O156:H8   | 1    | -    | gamma           | ent/espL2 | nleB | nleE | nleH1-2 | -    |
| O84:H2    | 1    | ehxA | zeta            | ent/espL2 | nleB | -    | nleH1-2 | nleA |
| O86:H40   | 1    | -    | theta           | ent/espL2 | nleB | nleE | -       | -    |
| O125:H6   | 1    | -    | alpha           | -         | -    | -    | -       | -    |
| O126:H6   | 1    | -    | alpha           | -         | -    | -    | -       | -    |
| O51       | 1    | -    | alpha           | -         | -    | -    | -       | -    |
| O76:H51   | 1    | -    | gamma           | -         | -    | -    | -       | -    |

\*: Cepa de referencia RDEC E22. \*\*: cepa de referencia ATCC43888. \*\*\*: cepa de referencia EPEC E2348/69.



ES 2 614 811 T3

Tabla 4 Cepas que dieron negativo para los genes *eae* y *nle*.

| Serotipo   | Número analizado | <i>E. coli</i> / otros | <i>ehxA</i> |
|------------|------------------|------------------------|-------------|
| O91:H21    | 11               | EHEC atípica           | <i>ehxA</i> |
| O91:H21    | 4                | EHEC atípica           | -           |
| O113:H21   | 8                | EHEC atípica           | <i>ehxA</i> |
| O113:H21   | 3                | EHEC atípica           | -           |
| O100:NM    | 5                | STEC                   | -           |
| O105:H18   | 2                | STEC                   | <i>ehxA</i> |
| O109:H-    | 1                | STEC                   | <i>ehxA</i> |
| O110       | 2                | STEC                   | -           |
| O111:H10   | 1                | STEC                   | -           |
| O113:H4    | 10               | STEC                   | <i>ehxA</i> |
| O113:H4    | 2                | STEC                   | -           |
| O115:H18   | 1                | STEC                   | <i>ehxA</i> |
| O116:H28   | 1                | STEC                   | <i>ehxA</i> |
| O117       | 2                | STEC                   | -           |
| O118:H12   | 3                | STEC                   | -           |
| O125       | 1                | STEC                   | <i>ehxA</i> |
| O126:H8    | 1                | STEC                   | -           |
| O128:H2    | 1                | STEC                   | <i>ehxA</i> |
| O136       | 3                | STEC                   | -           |
| O138       | 1                | STEC                   | -           |
| O139:H1    | 1                | STEC                   | -           |
| O139:ND    | 1                | STEC                   | -           |
| O141:[H4]  | 1                | STEC                   | -           |
| O141:H2    | 1                | STEC                   | -           |
| O141ac     | 1                | STEC                   | -           |
| O145       | 1                | STEC                   | -           |
| O146:H28   | 1                | STEC                   | <i>ehxA</i> |
| O146:H28   | 4                | STEC                   | -           |
| O146:H8    | 1                | STEC                   | -           |
| O147       | 1                | STEC                   | -           |
| O149:[H19] | 1                | STEC                   | <i>ehxA</i> |
| O15:H16    | 1                | STEC                   | -           |
| O168:H8    | 1                | STEC                   | -           |
| O171:H2    | 1                | STEC                   | -           |

ES 2 614 811 T3

|          |   |      |      |
|----------|---|------|------|
| O174:H-  | 1 | STEC | -    |
| O174:H2  | 5 | STEC | ehxA |
| O174:H21 | 9 | STEC | -    |
| O174:H8  | 1 | STEC | -    |
| O174:H8  | 1 | STEC | ehxA |
| O178:H19 | 2 | STEC | ehxA |
| O2:H27   | 1 | STEC | ehxA |
| O21:NM   | 2 | STEC | ehxA |
| O21:H21  | 4 | STEC | ehxA |
| O22:H16  | 2 | STEC | -    |
| O22:H16  | 2 | STEC | ehxA |
| O22:H8   | 2 | STEC | -    |
| O22:H8   | 2 | STEC | ehxA |
| O22:Hr   | 1 | STEC | ehxA |
| O23:H15  | 1 | STEC | ehxA |
| O3       | 2 | STEC | ehxA |
| O30:H12  | 1 | STEC | -    |
| O39:H48  | 1 | STEC | ehxA |
| O40:H21  | 1 | STEC | ehxA |
| O41:H7   | 1 | STEC | -    |
| O46:H38  | 2 | STEC | ehxA |
| O48      | 2 | STEC | ehxA |
| O5       | 1 | STEC | ehxA |
| O53      | 2 | STEC | -    |
| O55:H19  | 1 | STEC | -    |
| O6       | 8 | STEC | -    |
| O6:H10   | 1 | STEC | ehxA |
| O6:H4    | 1 | STEC | -    |
| O60      | 1 | STEC | -    |
| O74:H42  | 1 | STEC | ehxA |
| O75:H8   | 1 | STEC | ehxA |
| O76      | 1 | STEC | ehxA |
| O76:H19  | 1 | STEC | ehxA |
| O76:H19  | 1 | STEC | -    |
| O77      | 2 | STEC | ehxA |
| O79      | 1 | STEC | ehxA |

ES 2 614 811 T3

|            |   |      |      |
|------------|---|------|------|
| O79:H48    | 1 | STEC | ehxA |
| O8:H8      | 2 | STEC | -    |
| O8:H19     | 4 | STEC | -    |
| O8:H19     | 1 | STEC | ehxA |
| O88:H25    | 1 | STEC | -    |
| O88        | 1 | STEC | ehxA |
| O91        | 1 | STEC | ehxA |
| O91        | 5 | STEC | -    |
| O91:H9     | 1 | STEC | ehxA |
| O91:H10    | 3 | STEC | -    |
| O96:H19    | 1 | STEC | ehxA |
| Or:H12     | 1 | STEC | -    |
| Or         | 2 | STEC | -    |
| Ox7:H16    | 1 | STEC | -    |
| Or:H16     | 1 | STEC | ehxA |
| Or:H4      | 1 | STEC | -    |
| <hr/>      |   |      |      |
| O26:H32    | 1 | ETEC | -    |
| <hr/>      |   |      |      |
| O1:K1:NM   | 1 | FEC  | -    |
| O11:NM     | 1 | FEC  | -    |
| O121:H10   | 2 | FEC  | -    |
| O125:H30   | 1 | FEC  | -    |
| O127       | 1 | FEC  | -    |
| O15:H1     | 1 | FEC  | -    |
| O16:K1:NM  | 1 | FEC  | -    |
| O17:H18    | 1 | FEC  | -    |
| O18:K1:H7  | 1 | FEC  | -    |
| O2:H1      | 1 | FEC  | -    |
| O2:H6      | 1 | FEC  | -    |
| O2:K1:H7   | 1 | FEC  | -    |
| O2:NM      | 1 | FEC  | -    |
| O21:H21    | 1 | FEC  | -    |
| O25:K5     | 1 | FEC  | -    |
| O4:H5      | 4 | FEC  | -    |
| O45:K1:H1  | 1 | FEC  | -    |
| O46:K1:H31 | 1 | FEC  | -    |
| O6:K+:NM   | 1 | FEC  | -    |

ES 2 614 811 T3

|                     |    |                       |   |
|---------------------|----|-----------------------|---|
| O7:K1:NM            | 1  | FEC                   | - |
| O75:K5:NM           | 1  | FEC                   | - |
| O78:NM              | 1  | FEC                   | - |
| O83:K1:H33          | 1  | FEC                   | - |
| O86                 | 1  | FEC                   | - |
| Or:NM               | 1  | FEC                   | - |
| <hr/>               |    |                       |   |
| O103:H8             | 1  | EC                    | - |
| O111:H8             | 1  | EC                    | - |
| O111:H10            | 1  | EC                    | - |
| O111:H12            | 1  | EC                    | - |
| O111:H21            | 1  | EC                    | - |
| O113:NM             | 1  | EC                    | - |
| O121:[H45]          | 1  | EC                    | - |
| O132:H18            | 1  | EC                    | - |
| O142                | 2  | EC                    | - |
| O145                | 2  | EC                    | - |
| O145:H2             | 1  | EC                    | - |
| O153:H12            | 1  | EC                    | - |
| O157, O157:[H7 neg] | 12 | EC                    | - |
| O157:H10            | 1  | EC                    | - |
| O157:H12            | 1  | EC                    | - |
| O157:H15            | 1  | EC                    | - |
| O157:H16            | 1  | EC                    | - |
| O157:H19            | 1  | EC                    | - |
| O157:H25            | 1  | EC                    | - |
| O157:H42            | 1  | EC                    | - |
| O157:H43            | 1  | EC                    | - |
| O2:H1               | 1  | EC                    | - |
| O26:H21             | 1  | EC                    | - |
| O55:H19             | 1  | EC                    | - |
| O6:H4               | 1  | EC                    | - |
| O62:H30             | 2  | EC                    | - |
| O <sub>NT</sub> :H7 | 1  | EC                    | - |
| O <sub>NT</sub>     | 1  | EC                    | - |
| <hr/>               |    |                       |   |
| N/A                 | 7  | <i>Salmonella sp.</i> | - |
| N/A                 | 1  | <i>Yersinia</i>       | - |

ES 2 614 811 T3

|     |   |                    |   |
|-----|---|--------------------|---|
| N/A | 3 | <i>Klebsiella</i>  | - |
| N/A | 4 | <i>Proteus</i>     | - |
| N/A | 1 | <i>Citrobacter</i> | - |
| N/A | 3 | <i>Hafnia</i>      | - |
| N/A | 2 | <i>Shigella</i>    | - |
| N/A | 1 | <i>C. sakasaki</i> | - |

Tabla 5. Porcentaje de cepas EHEC con complemento especificado del gen *nle* y subtipo *eae* para serotipos de EHEC comunes.

| Serotipo (N° de cepas analizadas) | % de cepas analizadas | <i>eae</i> | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|-----------------------------------|-----------------------|------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| O157:H7 (76)                      | 89%                   | $\gamma$   | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|                                   | 8%                    | $\gamma$   | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|                                   | 3%                    | $\gamma$   | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> |             |
| O103:H2 (25)                      | 92%                   | $\epsilon$ | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> |             |
|                                   | 8%                    | $\epsilon$ | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> |             |
| O111:H8/H- (24)                   | 92%                   | $\theta$   | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|                                   | 4%                    | $\theta$   | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|                                   | 4%                    | $\theta$   | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O26:H11 (34)                      | 62%                   | $\beta$    | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|                                   | 20%                   | $\beta$    | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|                                   | 12%                   | $\beta$    | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|                                   | 3%                    | $\beta$    | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> |             |
|                                   | 3%                    | $\beta$    | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             |                | <i>nleA</i> |
| O145:H28 (18)                     | 94%                   | $\gamma$   | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> |             |
|                                   | 6%                    | $\gamma$   | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |

Tabla 6. Complemento del gen *nle* y subtipo de *eae* para serotipos de EHEC no comunes.

| Serotipo | <i>eae</i> | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
|----------|------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| O5:H-    | $\beta$    | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O55:H7   | $\gamma$   | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O45:H2   | $\epsilon$ | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> |             |
| O118:H16 | $\beta$    | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O118:H16 | $\beta$    | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O121:H19 | $\epsilon$ | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |

ES 2 614 811 T3

|          |   |                 |             |             |             |                |             |
|----------|---|-----------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| O123:H11 | β | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O165:H25 | ε | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O172:H25 | ε | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |
| O15:H2   | β | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> |             | <i>nleH1-2</i> |             |
| O103:H25 | θ | <i>ent/esp2</i> | <i>nleB</i> | <i>nleE</i> | <i>nleF</i> | <i>nleH1-2</i> | <i>nleA</i> |

Tabla 7 Presencia de marcadores genéticos asociados a EHEC y EPEC en cepas de *E. coli* y asociación con alelos de *nleB*

|              |                        | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>espK</i> | <i>nleB</i> | <i>nleB2*</i> |
|--------------|------------------------|------------|------------|-------------|-------------|---------------|
| EHEC Típicas | O103:H2 / H- (n = 14)  | +          | +          | +           | +           | +             |
|              | O145:H28 / H- (n = 12) | +          | +          | +           | +           | +             |
|              | O111:H8 / H- (n = 14)  | +          | +          | +           | +           | +             |
|              | O157:H7 / H- (n = 50)  | +          | +          | +           | +           | +             |
|              | O26:H11 / H- (n = 30)  | +          | +          | +           | +           | +             |
|              | O121:H19 / H- (n = 6)  | +          | +          | +           | +           | +             |
| EPEC         | O100:H- (n = 1)        | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | O111:H11 (n = 2)       | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | O117:H25 (n = 1)       | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | O119:H8 (n = 2)        | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | O119:H25 / H- (n = 2)  | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | O22?:H7 (n = 1)        | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | O76:H41 (n = 1)        | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | O76:H7 (n = 4)         | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | O80:H- (n = 3)         | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | O84:H- (n = 1)         | -          | +          | +           | +           | +             |
|              | Ont:H2 (n = 2)         | -          | +          | +           | +           | +             |
| EPEC típicas | O103:H2 (n = 1)        | -          | +          | +           | +           | -             |
|              | O114:H2 (n = 10)       | -          | +          | +           | +           | -             |
|              | O119:H2 (n = 1)        | -          | +          | +           | +           | -             |
|              | O128:H- (n = 1)        | -          | +          | +           | +           | -             |
|              | Ont:H2 (n = 1)         | -          | +          | +           | +           | -             |
| EPEC         | O111:H19 (n = 3)       | -          | +          | +           | -           | -             |
|              | O111:H9 (n = 3)        | -          | +          | +           | -           | -             |

ES 2 614 811 T3

|      |                      |   |   |   |   |   |
|------|----------------------|---|---|---|---|---|
|      | O115:H38 (n = 1)     | - | + | + | - | - |
|      | O119:H9 (n = 1)      | - | + | + | - | - |
|      | O145:H1 (n = 1)      | - | + | + | - | - |
|      | O145:H19 (n = 1)     | - | + | + | - | - |
|      | O145:H28 (n = 2)     | - | + | + | - | - |
|      | O157:H26 (n = 1)     | - | + | + | - | - |
|      | O28:H28 (n = 3)      | - | + | + | - | - |
|      | O49:H35/H10 (n = 1)  | - | + | + | - | - |
|      | Ont:H26 (n = 1)      | - | + | + | - | - |
|      | Ont:NM (n = 1)       | - | + | + | - | - |
| EPEC | O100:H25 (n = 1)     | - | + | - | + | + |
|      | O109?:H25 (n = 1)    | - | + | - | + | + |
|      | O111:H25 (n = 1)     | - | + | - | + | + |
|      | O117:H40b (n = 3)    | - | + | - | + | + |
|      | O118:H8a (n = 3)     | - | + | - | + | + |
|      | O119:H25 (n = 1)     | - | + | - | + | + |
|      | O127 (n = 4)         | - | + | - | + | + |
|      | O127:H40 (n = 3)     | - | + | - | + | + |
|      | O127:H8 (n = 1)      | - | + | - | + | + |
|      | O128:H2 (n = 1)      | - | + | - | + | + |
|      | O128:H8 (n = 1)      | - | + | - | + | + |
|      | O15:H11 (n = 1)      | - | + | - | + | + |
|      | O15:H2 (n = 2)       | - | + | - | + | + |
|      | O153:H14 (n = 1)     | - | + | - | + | + |
|      | O156:H8 (n = 1)      | - | + | - | + | + |
|      | O2:H40b (n = 1)      | - | + | - | + | + |
|      | O2:H8 (n = 1)        | - | + | - | + | + |
|      | O2:H- (n = 2)        | - | + | - | + | + |
|      | O21:H25 (n = 1)      | - | + | - | + | + |
|      | O26:H11 / H- (n = 5) | - | + | - | + | + |
|      | O3:H40b (n = 1)      | - | + | - | + | + |
|      | O3:H5 (n = 1)        | - | + | - | + | + |
|      | O3:H8a (n = 3)       | - | + | - | + | + |
|      | O45:H7 (n = 1)       | - | + | - | + | + |
|      | O55 (n = 2)          | - | + | - | + | + |

ES 2 614 811 T3

|              |                     |   |   |   |   |   |
|--------------|---------------------|---|---|---|---|---|
|              | O55:H7 (n = 15)     | - | + | - | + | + |
|              | O66:H8a (n = 1)     | - | + | - | + | + |
|              | O70:H11 (n = 5)     | - | + | - | + | + |
|              | O71:H40b (n = 1)    | - | + | - | + | + |
|              | O76:H7 (n = 1)      | - | + | - | + | + |
|              | O86:H11 (n = 2)     | - | + | - | + | + |
|              | ONT:H21 (n = 4)     | - | + | - | + | + |
|              | Orough/H40b (n = 2) | - | + | - | + | + |
|              | Orough:H8a (n = 1)  | - | + | - | + | + |
|              | OX177:H11 (n = 2)   | - | + | - | + | + |
| EPEC típicas | O111:H2 (n = 17)    | - | + | - | + | - |
|              | O111:H25 (n = 1)    | - | + | - | + | - |
|              | O119:H2 (n = 2)     | - | + | - | + | - |
|              | O126:H27 (n = 1)    | - | + | - | + | - |
|              | O127:H6 (n = 1)     | - | + | - | + | - |
|              | O128:H2 (n = 1)     | - | + | - | + | - |
|              | O55:H6 (n = 5)      | - | + | - | + | - |
|              | O119s:H2 (n = 1)    | - | + | - | + | - |
|              | O142:H6 (n = 3)     | - | + | - | + | - |
|              | Orough:H7           | - | + | - | + | - |
| EPEC         | O102:H19 (n = 1)    | - | + | - | - | - |
|              | O103:H2 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
|              | O108:H9 (n = 6)     | - | + | - | - | - |
|              | O111:H2 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
|              | O113:H6 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
|              | O114:H49 (n = 5)    | - | + | - | - | - |
|              | O115:H38 (n = 2)    | - | + | - | - | - |
|              | O118:H5 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
|              | O119:H6 (n = 4)     | - | + | - | - | - |
|              | O119:NT (n = 1)     | - | + | - | - | - |
|              | O123/O4:H45 (n = 2) | - | + | - | - | - |
|              | O123:H25 (n = 1)    | - | + | - | - | - |
|              | O125ac:H6 (n = 6)   | - | + | - | - | - |
|              | O126:H27 (n = 1)    | - | + | - | - | - |
|              | O127:H19 (n = 1)    | - | + | - | - | - |



ES 2 614 811 T3

|                      |   |   |   |   |   |
|----------------------|---|---|---|---|---|
| O127:H21 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
| O128:H2 (n = 10)     | - | + | - | - | - |
| O142:H34 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
| O145:H34 (n = 5)     | - | + | - | - | - |
| O150:H8 (n = 1)      | - | + | - | - | - |
| O157 (n = 2)         | - | + | - | - | - |
| O157:H16 (n = 4)     | - | + | - | - | - |
| O157:H45 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
| O168:H-/? (n = 1)    | - | + | - | - | - |
| O177:H26 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
| O26:H11 (n = 1)      | - | + | - | - | - |
| O28:H28              | - | + | - | - | - |
| O4:H16 (n = 1)       | - | + | - | - | - |
| O45:H9 (n = 1)       | - | + | - | - | - |
| O49:H10 / H- (n = 2) | - | + | - | - | - |
| O5:H- (n = 1)        | - | + | - | - | - |
| O5:H11 (n = 1)       | - | + | - | - | - |
| O51:H49 (n = 3)      | - | + | - | - | - |
| O55 (n = 1)          | - | + | - | - | - |
| O55:H37 (n = 1)      | - | + | - | - | - |
| O55:H7 (n = 1)       | - | + | - | - | - |
| O62:H9 (n = 1)       | - | + | - | - | - |
| O63:H-/H6 (n = 2)    | - | + | - | - | - |
| O65:H-/H25 (n = 1)   | - | + | - | - | - |
| O69:H2 (n = 1)       | - | + | - | - | - |
| O69:H16 (n = 2)      | - | + | - | - | - |
| O70/O86:H2 (n = 1)   | - | + | - | - | - |
| O86 (n = 2)          | - | + | - | - | - |
| O86:H34 (n = 2)      | - | + | - | - | - |
| O86:H8 (n = 4)       | - | + | - | - | - |
| O86:NT (n = 1)       | - | + | - | - | - |
| O88:H8a (n = 1)      | - | + | - | - | - |
| O9/O25:H10 (n = 1)   | - | + | - | - | - |
| OK8:H10 (n = 1)      | - | + | - | - | - |
| Ont:H11 (n = 1)      | - | + | - | - | - |

## ES 2 614 811 T3

|  |                    |   |   |   |   |   |
|--|--------------------|---|---|---|---|---|
|  | Ont:H14 (n = 1)    | - | + | - | - | - |
|  | Ont:H2 (n = 3)     | - | + | - | - | - |
|  | Ont:H24 (n = 1)    | - | + | - | - | - |
|  | Ont:H40b (n = 1)   | - | + | - | - | - |
|  | Ont:H6 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
|  | Ont:H7 (n = 1)     | - | + | - | - | - |
|  | Ont:Hrough (n = 1) | - | + | - | - | - |
|  | Ont:H- (n = 1)     | - | + | - | - | - |
|  | Orough:H10 (n = 1) | - | + | - | - | - |
|  | Orough:H6 (n = 1)  | - | + | - | - | - |
|  | Orough:H9 (n = 1)  | - | + | - | - | - |
|  | OX177:H6 (n = 1)   | - | + | - | - | - |

\*: “-“ significa PCR negativa o valores altos de Ct obtenidos con el set de cebadores de nleB2.

## Referencias

- Anonymous.** 2005. European Commission Annual Report 2005: surveillance of enteric pathogens in Europe and beyond; 1786/2002/EC. International surveillance network for the enteric infections–*Salmonella*, VTEC O157 and *Campylobacter*. European Commission, Brussels, Belgium.
- Beutin, L., A. Miko, G. Krause, K. Pries, S. Haby, K. Steege, y N. Albrecht.** 2007. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **73(15)**: 4769-4775.
- Beutin, L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, y K. Gleier.** 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1099-1108.
- Beutin, L., H. Steinruck, G. Krause, K. Steege, S. Haby, G. Hultsch, y B. Appel.** 2007. Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 630-639.
- Beutin, L., S. Jahn, y P. Fach.** 2009. Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *J. Appl. Microbiol.* **106(4)**: 1122-1132.
- Bielaszewska, M., R. Köck, A. W. Friedrich, C. Von Eiff, L. B. Zimmerhackl, H. Karch, y A. Mellmann.** 2007. Shiga toxin – mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS One.* **2(10)**: e1024.
- Brooks, J. T., E. G. Sowers, J. G. Wells, K. D. Greene, P. M. Griffin, R. M. Hoekstra, y N. A. Strockbine.** 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J. Infect. Dis.* **192(8)**: 1422-1429.
- Chang, C.** 1991 “Branched DNA Amplification Multimers for the Sensitive, Direct Detection of Human Hepatitis Viruses,” *Nucleic Acids Symposium Series*, no. 24: 197–200.
- Compton, J.** 1991 “Nucleic Acid Sequence-Based Amplification,” *Nature* 350, no. 6313: 91–92.

**Creuzburg, K., y H. Schmidt.** 2007. Molecular characterization and distribution of genes encoding members of the type III effector nleA family among pathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **45(8)**: 2498-2507.

**EFSA.** 2007. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic types. *The EFSA Journal* **579**: 1-61.

**Eklund, M., F. Scheutz, y A. Siitonen.** 2001. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J. Clin. Microbiol.* **39(8)**: 2829-2834.

**Elliott, S.J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg, y J. B. Kaper.** 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* **28(1)**: 1-4.

**Ewing, W.H.** 1986. Differentiation of *Enterobacteriaceae* by Biochemical Reactions. In *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae* ed. Ewing, W.H. pp. 47-72. Elsevier Science Publishing Co.

**Fach, P., S. Perelle, F. Dilasser, y J. Grout.** 2001. Comparison between a PCRELISA test and the Vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 809-818.

**Friedrich, A. W., W. Zhang, M. Bielaszewska, A. Mellmann, R. Köck, A. Fruth, H. Tschäpe, y H. Karch.** 2007. Prevalence, virulence profiles, and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clin. Infect. Dis.* **45(1)**: 39-45.

**Karmali, M. A., B. T. Steele, M. Petric, y C. Lim.** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* **1(8325)**: 619-620.

**Karmali, M. A., M. Mascarenhas, S. Shen, K. Ziebell, S. Johnson, R. Reid-Smith, J. Isaac-Renton, C. Clark, K. Rahn, y J. B. Kaper.** 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4930-4940.

**Kozub-Witkowski, E., G. Krause, G. Frankel, D. Kramer, B. Appel, y L. Beutin.** 2008. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic

*Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J. Appl. Microbiol.* **104**: 403-410.

**Lawrence, J. G.** 2005. Common themes in the genome strategies of pathogens. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**: 584–588.

**Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* That Cause Diarrhea - Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**: 377-389.

**Loukiadis, E., K  rour  dan, M., Beutin, L., Oswald, E., y Brug  re, H.,** 2006. Characterization of Shiga Toxin Gene (*stx*)-Positive and Intimin Gene (*eae*)-Positive *Escherichia coli* Isolates from Wastewater of Slaughterhouses in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, May; **72**: 3245 - 3251.

**Mackay, I.** 2007. Real-time PCR in Microbiology, from diagnosis to characterization. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

**Maidhof, H., B. Guerra, S. Abbas, H. M. Elsheikha, T.S. Whittam, y L. Beutin.** 2002. A multiresistant clone of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O118:[H16] is spread in cattle and humans over different European countries. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(12)**: 5834-5842.

**McLean, C., K. A. Bettelheim, A. Kuzevski, L. Falconer, y S. P. Djordjevic.** 2005. Isolation of *Escherichia coli* O5:H-, possessing genes for Shiga toxin 1, intimin- $\beta$  and enterohaemolysin, from an intestinal biopsy from an adult case of bloody diarrhoea: evidence for two distinct O5:H- pathotypes. *J. Med. Microbiol.* **54**: 605–607.

**Nataro, J. P. y J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.

**Nielsen, E. M. y M. T. Andersen.** 2003. Detection and characterization of verocytotoxin producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2884-2893.

**Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., y Hase, T.** 2000 Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **28**, no. 12: E63.

**Oswald, E., H. Schmidt, S. Morabito, H. Karch, O. Marches, y A. Caprioli.** 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* **68**: 64-71.

Perelle, S., F. Dilasser, J. Grout, y P. Fach. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes*. **18**: 185-192.

Perna, N. T., G. F. Mayhew, G. Pósfai, S. Elliott, M. S. Donnenberg, J. B. Kaper, y F. R. Blattner. 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. **66**(8): 3810-3817.

Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, y M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med*. **308**(12): 681-685.

Schimmer, B., K. Nygard, H.M. Eriksen, J. Lassen, B.A. Lindstedt, L. T. Brandal, G. Kapperud, y P. Aavitsland. 2008. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by *stx2*-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infect. Dis*. **8**:41

Starr, M., V. Bennett-Wood, A. K. Bigham, T. F. de Koning-Ward, A. M. Bordun, D. Lightfoot, K. A. Bettelheim, C. L. Jones, y R. M. Robins-Browne. 1998. Hemolytic-uremic syndrome following urinary tract infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli*: case report and review. *Clin Infect Dis*. **27**(2): 310-315.

Tarr, C. L. y T. S. Whittam. 2002. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **184**: 479-487.

Walker, G., Fraiser, M., Schram, J., Little, M., Nadeau, J., y Douglas P. Malinowski, D. 1992 Strand Displacement Amplification—An Isothermal, In Vitro DNA Amplification Technique, *Nucleic Acids Research* 20, no. 7: 1691–1696.

Werber, D., L. Beutin, R. Pichner, K. Stark, y A. Fruth. 2008. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Serogroups in Food and Patients, Germany. *Emerg Infect Dis*. November; **14**(11): 1803–1806.

Yaradou, D. F., S. Hallier-Soulier, S. Moreau, F. Poty, Y. Hillion, M. Reyrolle, J. Andre, G. Festoc, K. Delabre, F. Vandenesch, J. Etienne, y S. Jarraud. 2007. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *App. Environment. Microbiol*. **73**: 1452-1456.

Zhang, W. L., B. Kohler, E. Oswald, L. Beutin, H. Karch, S. Morabito, A. Caprioli, S. Suerbaum, y H. Schmidt. 2002. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol*. **40**: 4486-4492.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> AGENCE NATIONALE CHARGÉE DE LA SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL FACH, Patrick BUGAREL, Marie BEUTIN, Lothar

- 5 <120> Un ensayo para determinar una evaluación del riesgo molecular de una muestra polimicrobiana compleja sospechosa de contener un EHEC.
- <130> F1159-6ex
- <160> 84
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 29
- 15 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> stx1 para cebador
- 20 <400> 1
- tftgtyactg tsacagcwga agcyttacg 29
- <210> 2
- 25 <211> 26
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 30 <223> stx1 cebador reverso
- <400> 2
- ccccagttca rwgtragrtc macrtc 26
- 35 <210> 3
- <211> 31
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> stx1 sonda
- <400> 3
- ctggatgatc tcagtgggcg ttcttatgta a 31
- 45 <210> 4
- <211> 29
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 50 <220>
- <223> stx2 para cebador
- <400> 4
- 55 tftgtyactg tsacagcwga agcyttacg 29
- <210> 5
- <211> 26
- <212> ADN
- 60 <213> Artificial
- <220>
- <223> stx2 cebador inverso

# ES 2 614 811 T3

<400> 5  
 ccccagttca rwgtragrtc macrtc 26

5 <210> 6  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> stx2 sonda

<400> 6  
 tcgtcaggca ctgtctgaaa ctgctcc 27

15 <210> 7  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> eae para cebador

<400> 7  
 cattgatcag gattttctg gtgata 26

25 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> eae cebador reverso

<400> 8  
 ctcatgcgga aatagccggt a 21

35 <210> 9  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> eae sonda

<400> 9  
 atagtctcgc cagtattcgc caccaatac 29

45 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> ehxA para cebador

<400> 10  
 ggtcagtag ggaagcgaac a 21

55 <210> 11  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> ehxA cebador reverso

65 <220>  
 <223> ehxA cebador reverso



# ES 2 614 811 T3

<400> 11  
atcatgtttt cgc caatg            19

5    <210> 12  
     <211> 26  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

10   <220>  
     <223> ehxA sonda

<400> 12  
cgtgatttg aattcagaac cgg tgg        26

15   <210> 13  
     <211> 24  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

20   <220>  
     <223> ent/espL2 para cebador

<400> 13  
tcttgatta tttctgcat ttca            24

25   <210> 14  
     <211> 22  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

30   <220>  
     <223> ent/espL2 cebador reverso

35   <400> 14  
     actattgcc a gtagccac aa            22

40   <210> 15  
     <211> 29  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

<220>  
<223> ent/espL2 sonda

45   <400> 15  
     aatggcatg cagacgcaat aaaggcata    29

50   <210> 16  
     <211> 23  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

<220>  
<223> nleB para cebador

<400> 16  
catgttgaag gctggaastt tgt 23

60   <210> 17  
     <211> 20  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

65   <220>  
     <223> nleB cebador reverso

# ES 2 614 811 T3

<400> 17  
ccgctacagg gcgatatgtt 20

5 <210> 18  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> nleB sonda

<400> 18  
acagagacgg gaaaaactgg atgcca 26

15 <210> 19  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> nleE para cebador

<400> 19  
agaagcgttt gaacctattt cca 23

25 <210> 20  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> nle cebador reverso

35 <400> 20  
ttggcggttt tccggatat 19

40 <210> 21  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> nleE sonda

45 <400> 21  
agccagtaca ccggaaggaa gctgg 25

50 <210> 22  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> nleF para cebador

<400> 22  
tgaggtgaga aatgaaata ctgatg 26

60 <210> 23  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

65 <220>  
<223> nleF cebador reverso

<400> 23  
 ctatccctgt cctctatcgt cattc 25

5 <210> 24  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> nleF sonda

<400> 24  
 tgtcggagcg ctgagggcg 19

15 <210> 25  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> nleH1-2 para cebador

25 <400> 25  
 acaagagaaa gtcatagtgg ttg 23

<210> 26  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> nleH1-2 cebador reverso

35 <400> 26  
 aatctcyccc ttagccatc cca 23

<210> 27  
 <211> 21  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> sonda nleH1-2 rev reverso

45 <400> 27  
 tttactaatc tgtgcacag g 21

<210> 28  
 <211> 25  
 50 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 55 <223> nleA para cebador

<400> 28  
 agataacyct aatactaaat atgcc 25

60 <210> 29  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

65 <220>  
 <223> nleA cebador reverso

ES 2 614 811 T3

<400> 29  
 gcccaaccat tgcrccgata tgagg 25

5 <210> 30  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> nleA sonda

<400> 30  
 ttctaccaa tgctgccgca aatgcgc 27

15 <210> 31  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> rfbE (0157) f

<400> 31  
 ttcacacrr arrggatggt ctcaa 25

25 <210> 32  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> rfbE (0157) r

<400> 32  
 cgatgagttt atctgcaagg tgat 24

35 <210> 33  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> rfbE (0157) sonda

<400> 33  
 aggaccgagc aggaaagaga ggaattaagg 30

45 <210> 34  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> wbd1 (0111) f

<400> 34  
 cgaggcaaca cattatatag tgcttt 26

55 <210> 35  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> wbd1 (0111) r

65 <220>  
 <223> wbd1 (0111) r

ES 2 614 811 T3

<400> 35  
 ttttgaata gttatgaaca tctgtttag c 31

5 <210> 36  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> wbdI (0111) sonda

<400> 36  
 ttgaatctcc cagatgatca acatcgtgaa 30

15 <210> 37  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> wzW (026) f

<400> 37 19  
 25 cgcgacggca gcgaaaatt 19

<210> 38  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> wzW (026) r

35 <400> 38  
 agcaggcttt tatattctcc aacttt 26

<210> 39  
 <211> 33  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> wzW (026) sonda

45 <400> 39  
 ccccgtaaa tcaatactat ttcacgaggt tga 33

<210> 40  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial

<220>  
 55 <223> lhp1 (0145) f

<400> 40  
 cgataatatt tacccacca gtacag 26

60 <210> 41  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

65 <220>  
 <223> lhp1 (0145) r

# ES 2 614 811 T3

<400> 41  
 gccgccgcaa tgctt           15

5   <210> 42  
     <211> 27  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

10   <220>  
     <223> lhp1 (0145) sonda

<400> 42  
 ccgccattca gaatgcacac aatatcg           27

15   <210> 43  
     <211> 24  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

20   <220>  
     <223> wzx (0103) f

<400> 43  
 caaggtgatt acgaaaatgc atgt           24

25   <210> 44  
     <211> 23  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

30   <220>  
     <223> wzx (0103) r

<400> 44  
 gaaaaaagca cccccgtact tat           23

35   <210> 45  
     <211> 18  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

40   <220>  
     <223> wzx (0103) sonda

<400> 45  
 catagcctgt tgtttat 18

45   <210> 46  
     <211> 22  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

50   <220>  
     <223> eae alpha f

<400> 46  
 gatacgaatg gctatgccaa ag           22

55   <210> 47  
     <211> 20  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

60   <220>  
     <223> eae alpha r

65   <220>  
     <223> eae alpha r

ES 2 614 811 T3

<400> 47  
 catcgctaac acgggcacta            20

5    <210> 48  
      <211> 30  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

10   <220>  
      <223> eae alpha sonda

<400> 48  
 aacatcgaca actccaggaa aatcactcgt            30

15   <210> 49  
      <211> 25  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

20   <220>  
      <223> eae beta f

<400> 49  
 25   ggtgataatc agagtgcgac ataca            25

     <210> 50  
      <211> 26  
      <212> ADN  
 30   <213> Artificial

     <220>  
      <223> eae beta r

<400> 50  
 35   ggcataaaaa tacgtaactc gagtat            26

     <210> 51  
      <211> 29  
 40   <212> ADN  
      <213> Artificial

     <220>  
      <223> eae beta sonda

45   <400> 51  
      ccacagcaat tacaatacta cccggtgca            29

     <210> 52  
      <211> 24  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

     <220>  
 55   <223> eae gamma f

     <400> 52  
      gactgttagt gcgacagtca gtga            24

60   <210> 53  
      <211> 26  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

65   <220>  
      <223> eae gamma r

# ES 2 614 811 T3

<400> 53  
 ttgtgtcaa tttcagtc atcaaa      26

5    <210> 54  
      <211> 26  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

10   <220>  
      <223> eae gamma sonda

<400> 54  
 tgacctcagt cgcttaacc tcagcc 26

15   <210> 55  
      <211> 25  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

20   <220>  
      <223> eae delta f

<400> 55  
 cattatccgg tgaagaagtg acttt      25

25   <210> 56  
      <211> 24  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

30   <220>  
      <223> eae delta r

<400> 56  
 cataaccact ctgatcggtc gtta      24

35   <210> 57  
      <211> 30  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

40   <220>  
      <223> eae delta sonda

<400> 57  
 ctttagtttt atccaatgcc ccaaatccg      30

45   <210> 58  
      <211> 24  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

50   <220>  
      <223> eae epsilon f

<400> 58  
 atacccaaat tggaaaacg gata      24

55   <210> 59  
      <211> 24  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

60   <220>  
      <223> eae epsilon r

65   <220>  
      <223> eae epsilon r



ES 2 614 811 T3

<400> 59  
 cactaacaac agcattacct gcaa        24

5    <210> 60  
      <211> 30  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

10   <220>  
      <223> eae epsilon sonda

<400> 60  
 ccagatgtca gtttaccgt agccctacca        30

15   <210> 61  
      <211> 24  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

20   <220>  
      <223> eae zetha f

<400> 61  
 gatgtcaaag cacctgaagt tgaa        24

25   <210> 62  
      <211> 23  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

30   <220>  
      <223> eae zetha r

<400> 62  
 cccttgatt ccagttccta caa        23

35   <210> 63  
      <211> 28  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

40   <220>  
      <223> eae zetha sonda

<400> 63  
 tcttcacccc acttgctatt gatgacgg        28

45   <210> 64  
      <211> 26  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

50   <220>  
      <223> eae theta f

<400> 64  
 tgtaaagca cctgaggta catttt        26

55   <210> 65  
      <211> 25  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

60   <220>  
      <223> eae theta r

65   <220>  
      <223> eae theta r

ES 2 614 811 T3

<400> 65  
 tcaccagtaa cggtcttacc aagaa 25

5 <210> 66  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> eae theta sonda

<400> 66  
 tcaacctgt gtcaatttt cagtccatca 30

15 <210> 67  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> wzx (0121) f

<400> 67  
 25 tggctctta gacttagggc 20

<210> 68  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> wzx (0121)

35 <400> 68  
 ttagcaattt tctgtagtcc agc 23

<210> 69  
 <211> 27  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> wzx (0121) sonda

45 <400> 69  
 tccaacaatt ggctgtaaaa cagctcg 27

<210> 70  
 <211> 23  
 50 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 55 <223> wzy (0118) f

<400> 70  
 atatttgac gatttacaga tgt 23

60 <210> 71  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

65 <220>  
 <223> wzy (0118) r

ES 2 614 811 T3

<400> 71  
 aaaatatgaa gcaaaataac agcc 24

5 <210> 72  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> wzy (0118) sonda

<400> 72  
 atattattga taccagtaat acttaaaatc tcttcc 36

15 <210> 73  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> wzx (045) f

<400> 73  
 25 tacgtctggc tgcaggg 17

<210> 74  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> wzx (045) r

35 <400> 74  
 acttcgagca aaaaatcccc 20

<210> 75  
 <211> 23  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> wzx (045) sonda

45 <400> 75 23  
 ttcgttgctg tgcgatggt ggc 23

<210> 76  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial

<220>  
 55 <223> wbgN (055) f

<400> 76 23  
 tgtaattcga tgcaccaatt cag 23

60 <210> 77  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

65 <220>  
 <223> wbgN (055) r

# ES 2 614 811 T3

<400> 77 22  
 cgcttcgacg ttcgatacat aa        22

5    <210> 78  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

10   <220>  
      <223> wbgN (055) sonda

<400> 78 21  
 tccgtgcata tacgccgcgg a        21

15   <210> 79  
      <211> 26  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

20   <220>  
      <223> nleB-2 f

<400> 79  
 25   tatyctctgg aacctattga tgaaaa        26

     <210> 80  
      <211> 22  
      <212> ADN  
 30   <213> Artificial

     <220>  
      <223> nleB-2 r

<400> 80  
 35   ccttttcgt atcgctctgg cc        22

     <210> 81  
      <211> 30  
 40   <212> ADN  
      <213> Artificial

     <220>  
      <223> nleB-2 taq

<400> 81  
 45   ttgctcaaa cactgaaaa agaatagggg        30

     <210> 82  
      <211> 26  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

     <220>  
 55   <223> espK f

     <400> 82  
      attgtaactg atgtatttc gtttgg        26

60   <210> 83  
      <211> 23  
      <212> ADN  
      <213> Artificial

65   <220>  
      <223> espK r

# ES 2 614 811 T3

<400> 83  
grcatcaaaa gcgaaatcac acc 23

5 <210> 84  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> espK sonda

<400> 84  
cagatactca atatcacaat cttgatata taaacgacc 39

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para llevar a cabo una evaluación del riesgo molecular (MRA) sobre una muestra sospechosa de contener una *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), que comprende las etapas:
- 5 a) poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de al menos los siguientes genes diana:
- *stx1*;
  - *stx2*;
- y los siguientes genes diana:
- *espK* o *espK* y *eae*;
- 10 y con un par de cebadores derivados de al menos uno de los siguientes genes diana:
- *nleB*;
  - *nleH1-2*;
  - *nleE*;
  - *ent/espL2*;
- 15 y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana; y si se detectan los productos de amplificación para cada uno de dichos genes de la etapa a) entonces:
- b) poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con uno o más pares de cebadores derivados del gen diana *eae* y determinar el subtipo de *eae*.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa b) los subtipos detectados de *eae* se seleccionan de un grupo que comprende *eae*  $\gamma$ ; *eae*  $\beta$ ; *eae*  $\theta$ ; *eae*  $\epsilon$ .
3. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho proceso también involucra:
- Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con uno o más pares de cebadores derivados de los genes diana *rfbE* (O157), *wbd1* (O111); *wzx* (O26); *ihp1* (O145); *wzx* (O103);
- y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana.
- 25 4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas:
- a) poner en contacto la muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:
- *stx1*;
  - *stx2*;
- 30 - *eae*;
- *espK*;
  - *nleB* o *ent/espL2*;
  - *rfbE* (O157);
- y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de los genes diana; y si se detectan los productos de amplificación para cada uno de dichos genes diana entonces:
- 35 b) poner en contacto la muestra o el ADN aislado de la misma con uno o más pares de cebadores derivados de los siguientes genes diana y/o subtipo de *eae*:
- *eae*  $\gamma$ ;
  - *eae*  $\beta$ ;
- 40 - *eae*  $\theta$ ;
- *eae*  $\epsilon$ ;

- *wbd1* (O111);
- *wzx* (026);
- *ihp1* (O145);
- *wzx* (0103);

5 y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de los genes diana.

5. Un proceso para llevar a cabo una evaluación del riesgo molecular (MRA) en una muestra sospechosa de contener una *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), que comprende las etapas:

Poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- 10
- *stx1*;
  - *stx2*;

y los siguientes genes diana:

- *espK* o *espK* y *eae*;

15 En donde dicho proceso se caracteriza por que también comprende poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de los siguientes genes diana:

- *nleB*;
- *nleH1-2*;
- *nleE*; y
- *ent/espL2*;

20 y detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación para cada uno de dichos genes diana.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, que adicionalmente comprende poner en contacto dicha muestra o el ADN aislado de la misma con un par de cebadores derivados de al menos uno de los siguientes genes diana:

- *ehxA*;
- *nleF*;

25 - *nleA*.

7. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho par de cebadores para cada uno de dichos genes diana comprende:

- *stx1*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

30 - *stx2*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *eae*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

35 - *espK*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *nleB*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 80 o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

- *nleH1-2*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

40 - *nleE*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;

## ES 2 614 811 T3

- *ent/espL2*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *ehxA*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - 5 - *nleF*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *nleA*, al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - 10 - *eae*  $\gamma$  utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *eae*  $\beta$  utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 50, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *eae*  $\theta$  utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - 15 - *eae*  $\epsilon$  utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 59, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *rfbE* (O157) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - 20 - *wbd1* (O111) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 35, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *wzw* (O26) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - *lhp1* (O145) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
  - 25 - *wzx* (O103) utilizando al menos un cebador definido por SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44, o un fragmento de los mismos de al menos quince nucleótidos;
8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dichos productos de amplificación se detectan utilizando una sonda degenerada definida para cada gen diana por las siguientes secuencias:
- *stx1*, SEQ ID NO: 3, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - 30 - *stx2*, SEQ ID NO: 6, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *eae*, SEQ ID NO: 9, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *espK*, SEQ ID NO: 84, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *ehxA* SEQ ID NO: 12, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *nleF* SEQ ID NO: 24, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - 35 - *nleB*, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 81, o un fragmento de las mismas de al menos quince nucleótidos;
  - *nleH1-2*, SEQ ID NO: 27, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *nleE*, SEQ ID NO: 21, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *nleA*, SEQ ID NO: 30, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *ent/espL2*, SEQ ID NO: 15, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - 40 - *eae*  $\gamma$ , SEQ ID NO: 54, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *eae*  $\beta$ , SEQ ID NO: 51, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *eae*  $\theta$ , SEQ ID NO: 66, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *eae*  $\epsilon$ , SEQ ID NO: 60, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;



- *rfbE* (O157), SEQ ID NO: 33, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *wbd1* (O111), SEQ ID NO: 36, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *wzw* (O26), SEQ ID NO: 39, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
  - *Ihp1* (O145), SEQ ID NO: 42, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos;
- 5 - *wzx* (O103), SEQ ID NO: 45, o un fragmento de la misma de al menos quince nucleótidos.
9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que adicionalmente comprende llevar a cabo un control negativo de PCR y/o un control de inhibición;
- y detectar la presencia o la ausencia del producto de amplificación de dichas reacciones.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dichas sondas están marcadas con al menos una etiqueta fluorescente.
11. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho proceso comprende una reacción de amplificación múltiple.
12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho proceso comprende una serie de reacciones de amplificación independientes.
- 15 13. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las reacciones de amplificación se llevan a cabo en una macromatriz.
14. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dichas reacciones de amplificación son reacciones de PCR en tiempo real.
- 20 15. Un kit para la detección de cepas de EHEC, que comprende el set de cebadores para cada uno de dichos genes diana definidos en las reivindicaciones 1 a 7, y opcionalmente las sondas degeneradas definidas en la reivindicación 8.