

Salgınlarla İlişkili STEC Suşlarının Filogeni ve Virülans Genlerinin *in silico* Analizi

In silico Analysis of Phylogeny and Virulence Genes in STEC Strains Associated with Outbreaks

Mehmet Demirci*¹, Akın Yiğın**², Fadile Yıldız Zeyrek***³

* Kırklareli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırklareli, Türkiye

** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

*** Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Atf/Cite as: Demirci M, Yiğın A, Zeyrek FY. Salgınlarla ilişkili STEC suşlarının filogeni ve virülans genlerinin *in silico* analizi, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):415-20.

Öz

Amaç: Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) suşlarını önemli bir gıda kaynaklı patojendir. Coğrafya, zaman veya kaynak farklı olsa bile STEC suşları ile önemli salgınlarla karşılaşabilmektedir. Biz de bu nedenle çalışmamızda, dünyanın farklı bölgelerinde önemli salgınlarda etken olarak saptanan ve genomik verileri açık veri tabanlarında bulunan EDL933 ve Sakai gibi STEC kökenlerini karşılaştırarak hangi virülans faktörlerini kullandıklarını ve bu kökenlerin birbirleri ile olan benzerliklerini *in silico* olarak karşılaştırmayı amaçladık.

Yöntem: Çalışmamıza farklı zamanlarda, dünyanın farklı bölgelerinde önemli salgınlar yapan yedi farklı SYEC suşu ve inek dışkılarından elde edilen bir süper bulaştırıcı kökene ait olmak üzere toplam sekiz suşun genomik verileri dâhil edildi. Kökenlere ait veriler NCBI veri tabanından indirildi. Filogeni analizi ve virülans gen analizleri sırasıyla CSI filogeni ve VFanalyzer online programlarıyla yapıldı.

Bulgular: Filogeni analizine göre EDL933 suşuna en benzer suş, %96.4 benzerlikle TW14588 suşuydu. En az benzeyen köken ise %79.15 benzerlikle Sakai kökeni olarak saptandı. Virülans genleri analizine göre ise dokuz başlık altında virülans faktörlerini meydana getiren 333 gene varlığı belirlendi. İlk STEC suşu EDL933'de, tüm virülans genlerinden %45'inin aktif olduğu saptandı. Stx genleri dışında tüm kökenlerde Ecp, Elf, Hcp gibi aderans genleri ve clyA gibi toksin genleri aktifti olduğu görüldü.

Sonuç: Çalışmamızda, salgınlarla ilişkili STEC kökenlerinin karşılaştırmalı genomik analizlerinde, stx geni dışında farklı virülans genlerini de kullandığı *in silico* olarak saptandı. Özellikle belli virülans genleri; kaynağı, zamanı ve lokasyonu farklı olsa da kullanması gereken genler olarak ön plana çıkmakta ve patogeneizde bu genleri kullanmaktadır.

Anahtar kelimeler: STEC, O157: H7, *in silico* analiz, virülans genleri

ABSTRACT

Objective: Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains are important foodborne pathogens. Significant outbreaks with STEC strains can be encountered, even if the geography, time or resources were different. The aim of our *in silico* study was to compare the virulence factors and phylogeny of STEC strains such as EDL933 and Sakai, which have been identified as an agent in important outbreaks in different parts of the world and whole genomic data were in open databases.

Method: Genomic NCBI data of eight strains were included in our study, including seven different STEC strains associated with significant epidemics in different parts of the world, and one super-shedder strain obtained from cattle feces.

Results: According to phylogeny analysis, the most similar strain to EDL933 strain was TW14588, with 96.4% similarity. The most distant similarity was Sakai strains with 79.2%. According to the virulence genes analysis; the presence of 333 genes that constitute virulence factors under nine headings were detected. In the first STEC origin, EDL933, 45% of all virulence genes were found to be active. Adherence genes such as Ecp, Elf, Hcp and toxin genes such as clyA were active in all strains except stx genes.

Conclusion: In our *in silico* study of comparative genomic analysis of STEC strains which are associated with outbreaks, it was determined that STEC strains used different virulence genes besides the stx gene. Indeed, they used certain virulence genes, even their sources, time and locations were different, in the pathogenesis.

Keywords: STEC, O157: H7, *in silico* analysis, virulence gene

Alındığı tarih / Received:

09.05.2021 / 09.May.2021

Kabul tarihi / Accepted:

06.08.2021 / 06.August.2021

Erken çevrimiçi / First Published:

23.09.2021 / 23.September.2021

ORCID Kayıtları

M. Demirci 0000-0001-9670-2426

A. Yiğın 0000-0001-9758-1697

F. Yıldız Zeyrek 0000-0001-7386-9944

✉ akinyigin@yahoo.com

GİRİŞ

Escherichia coli, insanlar ve hayvanların normal flora-sında bulunan hem kommensal bir bakteri hem de intra ve extra intestinal ciddi enfeksiyonlara da neden olabilen önemli patojen bir bakteridir⁽¹⁾. Gastroenteritlere neden olabilen diyarejenik *E. coli* (DEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffüz aderan *E. coli* (DAEC) olmak üzere 6 farklı patotipi vardır⁽²⁾. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) O157:H7, şiddetli-kanlı ishallerine neden olan gıda kaynaklı patojenler arasında çok önemli türdür. Bu kanlı ishaller, Shiga toksin kaynaklı olduğu için EHEC ayrıca Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) olarak da adlandırılmaktadır^(3,4). STEC, kromozomal genler tarafından kodlanan çok farklı virülans faktörlerine sahiptir ve bunlar genellikle patojenite adalarında (PAI'ler) veya plazmidlerinde bulunur. *stx* geni aracılı shiga toksininin üretimi, STEC suşlarının endotel hücre hasarına yol açan en önemli faktörlerden birisidir. *stx* genlerinin farklı alt tipleri bulunmaktadır ve bu farklılık hastalığın şiddeti açısından önemli bir belirteç olmakla birlikte, *stx*'in tüm patojeniteden tek başına sorumlu olduğu anlamına gelmediği, birçok virülans faktörünün işin içine dâhil olduğu da bildirilmektedir⁽⁴⁾. STEC suşları insanlar ve çok farklı sıcakkanlı hayvanlarda saptanabilmektedirler ama özellikle geviş getiren hayvanlar, insanlarda görülen enfeksiyonlar için ana rezervuardırlar ve bu nedenle STEC kaynaklı besin zehirlenmelerinin ana kaynağı sayılmaktadırlar⁽⁵⁾. İlk defa 1983 yılında Amerika'nın Michigan şehrinde meydana gelen salgında dana kıymalarından elde edilmiş olan *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 EDL933 suşu ile bu suşlar tanınmıştır⁽⁶⁾. Daha sonra 1996 yılında Japonya'nın Sakai şehrinde beyaz turp filizi tüketimi sonucunda olduğu saptanan ve özellikle okul çağındaki çocukları etkileyen *E. coli* O157:H7 Sakai suşu salgınıyla kendini göstermiştir⁽⁷⁾. Son yıllarda tüm genom dizileme (WGS) gibi yeni ve detaylı moleküler tekniklerin gelişmesi, STEC suşlarının epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesine katkı sağlamıştır⁽⁸⁾. Ayrıca bu yöntemler, farklı virülans faktörlerinin belirlenmesini sağlayarak, özellikle halk sağlığına katkı

sağlamaktadır⁽⁹⁾. Biz de bu nedenle çalışmamızda, dünyanın farklı bölgelerinde önemli salgınlar yapan ve tüm genom dizileme teknikleri ile dizilenecek genomik verileri açık veri tabanlarında bulunan EDL933 ve Sakai gibi *E. coli* O157:H7 suşları karşılaştırarak hangi virülans faktörlerini kullandıklarını ve bu suşların birbirleri ile olan benzerliklerini *in silico* olarak karşılaştırmayı amaçladık.

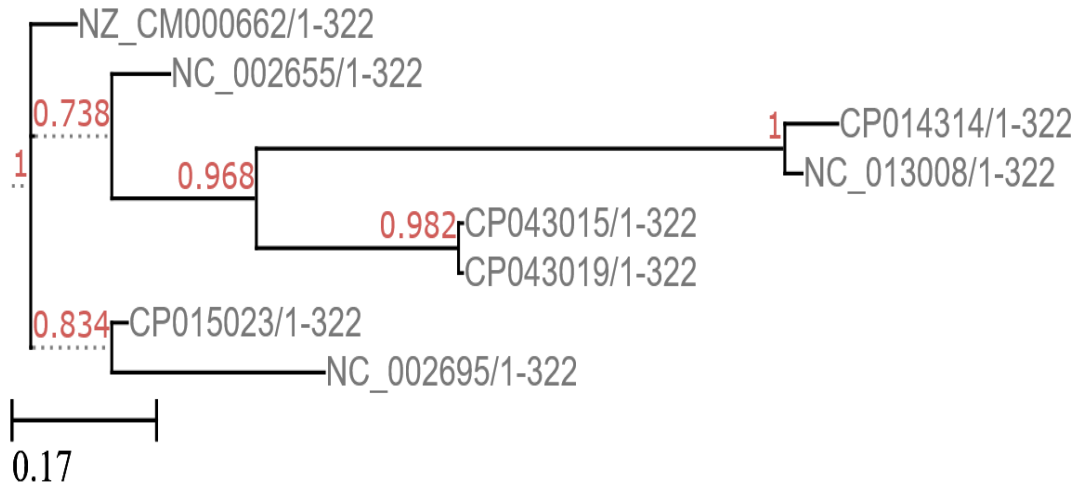
GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamıza, farklı zamanlarda dünyanın farklı bölgelerinde önemli salgınlar yapan yedi farklı *E. coli* O157:H7 suşu genomik verileri dâhil edildi. Bu suşların tüm genom analizlerine ait genomik verileri NCBI veri tabanından indirilerek çalışmamızda kullanıldı. Bu suşların virülans özelliklerini karşılaştırmak amacıyla inek dışkısında saptanan ve süper yayıcı karakterde olduğu bildirilen bir suş çalışmamıza dâhil edildi. Ayrıca çalışmamıza dâhil edilen *E. coli* O157 suşlarının seçilmesinde bu suşun tanımlanmasına neden olan, salgınları ile sıklıkla makalelere konu edilmiş, birçok yayında referans suş olarak kullanılan ve WGS analizleri tüm olarak tamamlanarak ayrıntılı olarak incelenmiş suşlar çalışmamızda seçerek incelemeye alınmıştır.

Bu suşlara ait NCBI erişim numaraları ve suş bilgileri Tablo 1'de verilmiştir. Bu suşların plazmidleri çalışmamıza dâhil edilmemiştir. Suşların birbirleri ile evrimsel olarak yakınlıkları CSI filogeni yazılımı ile (<https://www.genomicepidemiology.org/>) gerçekleştirildi. CSI filogeni yazılımı, büyük fasta dosyaları üstünde tek nokta polimorfizmlerini (SNP) otomatik olarak kontrol ederek tüm karşılaştırılan dizilerde bunları incelemektedir ve yazılım genomlardaki SNP'leri filtreleyerek, bölgelerin doğrulamasını yapmaktadır. Sistem tarafından oluşturulan bu yüksek kaliteli SNP'lerin birleştirilmiş hizalamalarına dayalı otomatik bir filogeni analizi çıkartmaktadır⁽¹⁰⁾. Suşlarda bulunan virülans genlerinin karşılaştırmalı analizi VF analiz programı (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) ile gerçekleştirildi. VF analiz programı da virülans genlerinin belirlenmesi için basit blastlama algoritması yerine karşılaştırılan referans genomlara göre taşınan açık okuma bölgelerinin otomatik olarak karşılaştırmalarını sağlamaktadır⁽¹¹⁾.

Tablo 1. Çalışmamıza dâhil edilen suşlara ait bilgiler ve benzerlik oranları.

NCBI gen bankası erişim numarası	Salgın nedeni	Suş Adı	Saptama Tarihi	Benzerlik oranı
NC_002655	Kontamine hamburgerleri içeren bir salgınla bağlantılı olarak Michigan dana kıymalarından izole edilmiş izolat	EDL933	1983, Amerika	100
NC_002695	Beyaz turp filizlerinin tüketimi ile ilişkili salgında, ilkökul çocuklarında izole edilmiş klinik izolat	Sakai	1996, Japonya	79.15
CP015023	Elma şarabı gibi asitlenmiş gıdalarla ilişkili salgında izole edilen izolat	SRCC 1675	2002, Amerika	95.84
NC_013008	İspanakla ilişkili salgında bir hastadan elde edilen klinik izolat	TW14359	2006, Amerika	93.30
NZ_CM000662	Iceberg Marul ile bağlantılı Taco John's restoranlarında gelişen salgında izole edilen klinik izolat	TW14588	2006, Amerika	96.40
CP043015	İşkembe gibi çiğ ürünlere temas sonrası gelişen salgında izole edilen klinik izolat	<i>Escherichia coli</i> 388808	2017, İngiltere	93.84
CP043019	İşkembe gibi çiğ ürünlere temas sonrası gelişen salgında izole edilen klinik izolat	<i>Escherichia coli</i> 397404	2017, İngiltere	96.15
CP014314	Süper bulaştırıcı suş (inek dışısından izole edilmiş)	JEONG-1266	2016, Amerika	93.40



Şekil 1. Suşların tek nokta polimorfizm (SNP) temelli benzerliğine göre filogeni ağacı.

BULGULAR

Çalışmamıza dâhil edilen suşlara ait genomik veriler analiz edildiğinde, dana kıymalarından 1982'deki salgında elde edilen EDL933 suşuna en benzer suşun, 2006'da yine Amerika'da marul kaynaklı salgında hastalardan izole edilen TW14588 suşunun olduğu belirlendi. Benzerlik oranı %96.4'tü. İngiltere'de 2017 yılında saptanan suşlardan birisi %96.15 oranında benzerlik gösterirken, aynı salgında izole edilen diğer suş %93.84 benzerdi. En düşük benzerliğin 1996'da

Japonya'nın Sakai kentindeki salgında çocuklarda belirlenen Sakai suşu olduğu ve benzerliğin %79.15 olduğu görüldü. Tüm suşlara ait benzerlik oranları Tablo 1'de verilmiştir. 2016'da Amerika'da süper bulaştırıcı karakterde olduğu saptanan ve inek dışıklarından elde edilen JEONG-1266 suşunun EDL933 suşuna benzerliğinin %93.4 olduğu bulundu (Şekil 1).

Çalışmamıza dâhil edilen suşlara ait virülans genlerinin dağılımı incelendiğinde, virülans genlerinin ade-rans, (19 öge - 89 gen), ototransporter (19 öge - 20

Tablo 2. Çalışmamıza dâhil edilen suşlara ait virülans genlerinin dağılımı.

	İlgili genler	NC_002655 EDL933	NC_002695 Sakai	NC_013008 TW14359	NZ_CM000662 TW14588	CP043015 388808	CP043019 397404	CP015023 SRCC 1675	CP014314 JEONG-1266
Aderans, (19 öge-89 gen)	89	26	24	24	24	25	25	25	26
Ototransporter (19 öge-20 gen)	20	5	5	4	4	5	5	4	3
invazyon (2 öge-4 gen)	4	2	2	2	2	2	2	2	2
Demir kullanımı (6 öge-33 gen)	33	7	7	7	8	8	8	8	8
LEE-encoded TTSS efektörleri (7 öge-7 gen)	7	7	7	7	5	5	5	5	5
Non-LEE encoded TTSS efektörleri (55 öge-55 gen)	55	47	46	45	39	37	37	37	38
Düzenleyici (1 öge-1 gen)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Sekresyon sistemi (5 öge-104 gen)	104	51	51	51	42	42	43	43	46
Toksin (10 öge-20 gen)	20	5	5	3	5	3	3	5	3
stx1A		+	+	+	+	+	+	+	+
stx1B		+	+	+	+	+	+	+	+
stx2A		+	+	+	+	+	+	+	+
stx2B		+	+	+	+	+	+	+	+
Taşınan virülans gen (Orf Sayısı)	333	150	147	143	129	127	128	129	131
Taşınan virülans gen (Orf Sayısı) (%)		45	44	43	39	38	38	39	39

gen), invazyon (2 öge - 4 gen), demir kullanımı (6 öge - 33 gen), LEE-encoded TTSS efektörleri (7 öge - 7 gen), non-LEE encoded TTSS efektörleri (55 öge - 55 gen), düzenleyici (1 öge - 1 gen), sekresyon sistemi (5 öge - 104 gen) ve toksin (10 öge - 20 gen) olmak üzere dokuz başlık altında olduğu saptandı. Bu 9 başlık altındaki virülans faktörlerini meydana getiren 333 virülans genini üretebilen açık okuma çerçevesi (orf) varlığı belirlendi. Toksin virülans faktörlerinden birisi olan *Stx* geni özellikleri incelendiğinde, 4 suşun *stx1a*, *1b*, *2a* ve *2b* üretimini yapabildikleri diğer 4 suşun ise yalnızca *stx2a* ve *2b* üretebilecek orf içerdikleri saptandı. Diğer virülans faktörleri incelendiğinde, virülans genini üretebilen açık okuma çerçevesi (orf) içermeleri açısından en düşük seviyede 2017'de İngiltere'de salgın oluşturan suşların olduğu belirlendi. Tüm orf bölgelerinin ortalama %38'inin bu suşlarda bulunduğu görüldü. EDL933 suşunda ise tüm virülans genleri oluşturan orf bölgelerinin %45'inin bulunduğu saptandı. Tüm suşlarda Aderans ile ilgili olarak *EaeH* geni, genel pili geni (*Ecp*), laminin bağlayıcı fimbria geni (*Elf*) ve hemorrhagic *E. coli* pilus (*Hcp*) genleri taşıyordu. Bakteriyel membranlarından direkt geçişle ilgili olan ototransporter genlerinden *EhaA*, *AIDA-I* type geni tüm suşlarda taşınmaktaydı. Toksin virülans faktörlerine *stx* dışında bakıldığında, *hemolysin/cytolysin A (hlyE/clyA)* geninin tüm suşlarda taşındığı saptandı.

TARTIŞMA

Escherichia coli O157:H7 veya Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) suşları, önemli bir gıda kaynaklı patojendir ve 1983'te tanımlandığından beri önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır⁽¹²⁾. *E. coli* O157:H7 ile ilişkili halk sağlığı risklerini değerlendirmek için, suşlar arasındaki fenotipik ve genotipik farklılıkları anlamak çok önemlidir⁽¹³⁾. Son yıllarda tüm genom dizileme (WGS) gibi yeni ve detaylı moleküler tekniklerin gelişmesi, STEC suşlarının epidemiyolojik özelliklerinin belirlenebilmesine ciddi katkı sağlamıştır⁽⁸⁾.

Wu ve ark.⁽¹²⁾ 2008 yılında *E. coli* O157:H7 suşları üstünde mikroarray yöntemi ile yaptıkları çalışmada, %80 ve üzerindeki benzerlikleri baz almışlardır ve bu

suşları benzer kabul etmişlerdir. Çalışmamızda, Sakai suşu dışında benzerliklerin %80 ve üstünde olduğunu gördük. Sakai EDL 933'e benzerliğin bir miktar daha düşük saptanması benzerlik analizine plazmidlerin dâhil edilmemiş olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Elhadidy ve ark.⁽¹³⁾, insan ve gıda kaynaklı suşlarda SNP benzerliklerini karşılaştırdıklarında, insanlarda saptanan suşların gıda kaynaklı suşlara %92 oranında benzer olduğunu belirlemişlerdir. Her ne kadar karşılaştırılan suşlar çalışmamıza tümüyle benzer olmamasına karşın, çalışmamızda da incelediğimiz suşlardaki benzerlik oranlarının klinik izolatlar da %90 ve üzerinde olduğu ve literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Escherichia coli O157:H7 suşlarının virülans genleri üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, çalışmaların öncelikle *stx* genlerine odaklandığı ve bu suşlardaki *stx* geni ve alt gruplarının tayin edilmeye çalışıldığı görülmektedir^(14,15). Teng ve ark.⁽¹⁶⁾ 2016 yılında inek dışkısında saptadıkları süper bulaştırıcı O157:H7 suşunun belirlenen ilk suş olan EDL933 suşuna virülans genleri açısından %80 ve üzeri benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Biz de çalışmamızda, incelediğimiz çalışmaların %80 ve üzerinde benzer virülans genlerini taşıdıklarını saptadık.

Rossez ve ark.⁽¹⁷⁾ 2014 yılında yaptıkları çalışmada, *E. coli* genel pili (*Ecp*) suşlarının genlerinin oligosakkaritlere bağlanması için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ispanak gibi sebzelerde özellikle *Ecp* geni proteinlerinin bağlanabileceği hedeflerinin daha fazla eksprese olduğunu belirlemişlerdir⁽¹⁷⁾. Biz de çalışmamızdaki tüm suşlarda bu pilusa ait genlerin taşındığını gördük. Samadder ve ark.⁽¹⁸⁾ 2009 yılında, *E. coli* laminin-bağlayıcı fimbriae (*Elf*) genlerinin insan epitel hücrelerine, inek ve domuz dokularına STEC suşlarının bağlanabilmesi için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da incelediğimiz tüm O157:H7 suşlarında *Elf* genlerinin taşındığını gördük. Ledesma ve ark.⁽¹⁹⁾ 2010 yılında yaptıkları çalışmada, *hemorajik E. coli pilus (HCP)* genlerinin özellikle *HcpA*'nın; IL-8 ve TNF-alfa gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğunu göstermişlerdir. *E. coli* O157:H7 suşlarının, kanlı ishal semptomlarına neden olabilmesi için bu gen ve

proteinlerinin olması gerektiğini bildirmişlerdir⁽¹⁹⁾. Tüm suşlarımızda bu genlerin orf bölgelerine sahip olması bu suşların bu geni taşıdıkları için kullanabilecek yetenekleri olduğunu bize düşündürmüştür. Wells ve ark.⁽²⁰⁾ 2008 yılında yaptıkları çalışmada, *E. coli* O157:H7 suşlarının bakteriyel membranlarından direkt geçişle ilgili olan ototransporter genlerinden *EhaA*, *AIDA-I type* geninin bu suşlarda ayrıca adezyon, kolonizasyon ve biyofilm oluşumuna katkıda sağladığını bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızda, tüm suşların da bu genin taşındığını ve ilgili orfların olduğunu gözlemledik.

Roderer ve ark.⁽²¹⁾ yaptıkları çalışmada, *Hemolysin/cytolysin A (hlyE/clyA)* geninin önemli bir por oluşturan toksin olduğunu bildirmişlerdir. Hunt ve ark.⁽²²⁾ da bu toksinin özellikle eritrosit ve memeli hücrelerinde por açmak için kullandıklarını açıklamışlardır. Bizim suşlarımızın da bu toksini diğer *stx* genleri yanında taşıyor olması bu bilgilerle benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda STEC (*Escherichia coli* O157:H7) suşlarının karşılaştırmalı genomik analizinde, *stx* geni dışında farklı virülans genlerini de taşıdıkları saptandı. Özellikle belli virülans genleri; kaynağı, zamanı ve lokasyonu farklı olsa da taşıdıkları genler olarak ön plana çıkmakta ve patogenezde bu genleri kullanabilecek şekilde genomlarında taşımaktadırlar. Tüm genom dizileme (WGS) gibi yeni moleküler teknikler özellikle tüm dünyada bu suşların surveyansı için kullanılabilir yöntemlerdir ve epidemiyolojisinin daha net anlaşılmasını sağlayacaktır.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

KAYNAKLAR

1. Clermont O, Olier M, Hoede C, et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol.*

- 2011;11(3):654-62.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.005>.
2. Miri ST, Dashti A, Mostaan S, et al. Identification of different *Escherichia coli* pathotypes in north and north-west provinces of Iran. *Iran J Microbiol*. 2017;9(1):33-7.
 3. Luzader DH, Willsey GG, Wargo MJ, et al. The type three secretion system 2-encoded regulator *EtrB* modulates enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene expression. *Infect Immun*. 2016;84(9):2555-65.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00407-16>
 4. Rubab M, Oh DH. Virulence characteristics and antibiotic resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(9):587.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9090587>
 5. Jajarmi M, Askari Badouei M, Imani Fooladi AA, et al. Pathogenic potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of caprine origin: virulence genes, Shiga toxin subtypes, phylogenetic background and clonal relatedness. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):97.
<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1407-2>
 6. Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, et al. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol*. 1983;18(3):512-20.
<https://doi.org/10.1128/JCM.18.3.512-520.1983>
 7. Michino H, Araki K, Minami S, et al. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol*. 1999;150(8):787-96.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010082>
 8. Holmes A, Allison L, Ward M, et al. Utility of whole-genome sequencing of *Escherichia coli* O157 for outbreak detection and epidemiological surveillance. *J Clin Microbiol*. 2015;53(11):3565-73.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01066-15>
 9. Lang C, Hiller M, Konrad R, et al. whole-genome-based public health surveillance of less common Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serovars and untypeable strains identifies four novel O genotypes. *J Clin Microbiol*. 2019;57(10): e00768-19.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00768-19>
 10. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, et al. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One*. 2014;9(8): e104984.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>
 11. Liu B, Zheng D, Jin Q, et al. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1): D687-92.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
 12. Wu G, Carter B, Mafura M, et al. Genetic diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates and identification of genes linked to human infections. *Infect Immun*. 2008;76(2):845-56.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00956-07>
 13. Elhadidy M, Elkhatib WF, Elfadl EAA, et al. Genetic diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 recovered from human and food sources. *Microbiology (Reading)*. 2015;161(Pt 1):112-9.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.083063-0>
 14. Greig DR, Jenkins C, Gharbia SE, et al. Analysis of a small outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 using long-read sequencing. *Microb Genom*. 2021;7(3).
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000545>
 15. Munns KD, Zaheer R, Xu Y, et al. Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from super-shedder and low-shedder cattle. *PLoS One*. 2016;11(3): e0151673.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151673>
 16. Teng L, Ginn A, Jeon S, et al. Complete genome sequence of an *Escherichia coli* O157:H7 strain isolated from a super-shedder steer. *Genome Announc*. 2016;4(2): e00258-16.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00258-16>
 17. Rossez Y, Holmes A, Lodberg-Pedersen H, et al. *Escherichia coli* common pilus (ECP) targets arabinosyl residues in plant cell walls to mediate adhesion to fresh produce plants. *J Biol Chem*. 2014;289(49):34349-65.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.587717>
 18. Samadder P, Xicohtencatl-Cortes J, Saldaña Z, et al. The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. *Environ Microbiol*. 2009;11(7):1815-26.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01906.x>
 19. Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, et al. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 2010;5(8):e12127.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012127>
 20. Wells TJ, Sherlock O, Rivas L, et al. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol*. 2008;10(3):589-604.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01479.x>
 21. Roderer D, Glockshuber R. Assembly mechanism of the α -pore-forming toxin cytolysin A from *Escherichia coli*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1726):20160211.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0211>
 22. Hunt S, Green J, Artymiuik PJ, et al. Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and related toxins. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 677:116-26.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6327-7_10