



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Movilidad de factores de virulencia del patógeno *E. Coli* O157:H7 y otros serotipos

Alexandre Martinez Castillo

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# Movilidad de factores de virulencia del patógeno *E. coli* O157:H7 y otros serotipos

Memoria presentada por

**Alexandre Martínez Castillo**

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

**Programa de doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología**

Directora,

Autor,

Dra. María Teresa Muniesa Pérez

Alexandre Martínez Castillo

Barcelona, Mayo de 2015



We cannot fathom the marvelous complexity of an organic being; but on the hypothesis here advanced this complexity is much increased. Each living creature must be looked at as a microcosm, a little universe, formed of a host of self-propagating organisms, inconceivably minute and as numerous as the stars in heaven.

**Charles Robert Darwin**

If you're going to try, go all the way. Otherwise, don't even start. And it will be better than anything else you can imagine. If you're going to try, go all the way. There is no other feeling like that. You will be alone with the gods, and the nights will flame with fire. You will ride life straight to perfect laughter. It's the only good fight there is.

**Charles Bukowski**





## AGRADECIMIENTOS

Una vez acabada la tesis sólo me queda agradecer a todos los que me habéis ayudado directa o indirectamente a que pudiera llegar hasta aquí. Lo primero en decir, es que aunque me ha costado lo suyo poder terminarla, la verdad que mirando hacia atrás y viendo como ha sido todo, la volvería a repetir una y otra vez. Ya no sólo por lo que he aprendido como científico, sino como persona. Intentaré agradeceréoslo individualmente, espero no dejarme a nadie.

A la primera persona que me gustaría agradecer el poder haber llevado a cabo esta tesis es a **Maite Muniesa**. Gracias por haberme dado la oportunidad de poder realizarla y de haberme soportado hasta poder finalizarla. Sé que he sido un pesado yendo mil veces a tu despacho, pero siempre has estado ahí para ayudarme y te has preocupado en que todo me fuera bien. Me has enseñado mucho durante todo este tiempo y gracias por haberte preocupado por mí tanto dentro y como fuera del laboratorio. Eres una jefa única y eso se nota en el buen rollo que hay en el laboratorio. También aparte de currar nos hemos reído con cervezas, desayunos en farmacia, calçotas, congresos (ejem, floja...), cambios de ruedas,...Eres una crack, no sé cómo te lo montas en hacer tantas cosas a la vez.

Al resto de jefes del grupo, empezando por **Joan**, que siempre que le he preguntado alguna duda ha estado predispuesto ayudarme. Las veces que habrás entrado en el laboratorio y nos has pillado haciendo y diciendo de todo menos cosas de trabajo, pero siempre te las has tomado con buen humor e incluso te has unido a las conversaciones. También agradecer a **Anicet** y a **Francisco** por haberme ayudado y aconsejado.

Al resto de jefes como **Susana**, por haberte ofrecido ayudarme siempre que te he pedido consejo, a **Carlos** porque siempre has estado dispuesto ayudarme cuando he ido a tu despacho a preguntarte por cualquier duda de laboratorio o papeleos del doctorado, y a **Rosina** y **Rosa** por haber sido tan amables conmigo y ayudarme en lo que necesitaba.

Empezando por los laboratorios, de los que primero me acuerdo, por supuesto son los del laboratorio 10.

**Andreu**, tú fuiste el primero que me tuviste que soportar. Me lo he pasado en grande contigo, porque grande eres un rato. Ya sabes que tú siempre serás el macho  $\alpha$ . Al principio pensaba, cómo curra este tío, te quedabas hasta muy tarde, pensaba que lo hacías por estar conmigo. Hasta que al final pájaro, me di cuenta que no era por mí.

A **Lejla**, que me engañaron contigo, me dijeron que tuviera cuidado que a mi lado se iba a sentar una bosnia con mala ostia. Y todo lo contrario, conmigo siempre te has portado muy bien y has sido muy cariñosa (eso no quita que tengas carácter) y aprehendí muchas cosas de ti. Siempre con tus frases célebres o cuando no querías hablar con alguien que se te olvidaba hablar castellano.

**Aiora**, anda que no te he dado la paliza. Al principio con donde esta tal cosa (cuando la tenía delante de mis narices), luego con cómo se pide esto, donde va esto otro, como funciona el Word,... Gracias por haberme ayudado y sobretodo hacerlo siempre con una sonrisa. Eso sí, tu lejos del pacharán.

**Anna, Marta Gomez y Marta Colomer**, empezamos los 4 el doctorado a la vez, y habéis tenido que aguantar mis bromas alguna más que otra. De antemano, gracias a las tres porque habéis sido únicas. **Anna**, las veces que me he intentado meterme contigo y siempre me has pillado “maldita”. Gracias porque siempre has estado dispuesta ayudarme en el laboratorio y me has enseñado protocolos, aparatos y como lavarse las manos hasta el codo tres veces. Menos mal que nos teníamos en algunos congresos para distraernos un rato, en otros nos diste algún susto, pero eso sí, tu nunca perdiste la sonrisa. **Marta Gómez**, tu tardaste un poco más en pillarme las coñas, pero al final no podía colarte ninguna. La chica Disney que hizo que después de tantos años, oyera una y otra vez canciones de la infancia. Me lo he pasado muy bien contigo. Congresos, viajes, comilonas, borracheras... hemos pasado grandes momentos juntos. **Marta Colomer**, tu todavía sigues cayendo en mis coñas. No sé todavía cómo me hablas después de todas la que te he hecho. ¿Qué te voy a decir? Ya sabes todo lo que pienso. Sin ti gran parte de esto no hubiera sido posible, hemos pasado grandes momentos juntos (y los que nos quedan....) desde las fallas hasta Cadaqués. Eso sí,

tu siempre mona, ya se para trabajar en el laboratorio con fular o ir al campo de excursión con tacones y bolso. Gracias por dejarme forma parte de tu vida.

**Pablo**, el asturiano del laboratorio y el peligro del departamento (Puxa Asturias). Hemos compartido borracheras, fiestas, cotilleos, y de vez en cuando hemos trabajado un poco y aunque a veces parecía que te ayudaba yo a ti, siempre que he necesitado algo, aunque estuvieras muy liado, has dejado de hacerlo y me has ayudado. Aunque seas del Madrid, eres una gran persona y siempre dispuesto ayudar.

**William**, o debería decir sir William o Will. Gracias por sacarme del laboratorio de vez en cuando y llevarme a muestrear, bueno más bien esperarte con un bocadillo en el coche. Eres muy trabajador y estoy seguro que llegarás muy lejos en Ecuador. Gracias por ayudarme con todas mis dudas químicas y no tan químicas. Eres un crack de los disfraces y al final, creo que ninguno ganará la apuesta

**Maryury**, mi compañera de poyata de los últimos meses. Gracias por haber sido tan paciente conmigo y dejarme que te invadiera de vez en cuando. Eres una currante muy metódica y ordenada. Siento que hayas tenido que escuchar todas las burradas que decíamos en la hora adulta y ya sabes que si necesitas una muestra sólo hay que pedirla.

**Miriam**, ahora ya como parte del laboratorio 10, me has ayudado cuando lo he necesitado y estas siempre en el laboratorio para echar una mano y eres nuestra Dj y jugadora de touch profesional.

A todos a aquellos que pasasteis por el laboratorio menos tiempo, como **Ferrán**, el terremoto de Badalona, eres una máquina, me hacías tantas preguntas que servían para refrescarme los conocimientos y las pocas cosas que tenía claras me las llegara a replantear, eso sí nos queda por hacer un Tri juntos. A **Carmen**, la dulce princesa de Disney que siempre sonreía, darte las gracias por haberme tenido que aguantar durante tu master, espero que hiciera que aprendieras algo.

A los compañeros del laboratorio 9, porque aunque hay un puerta de por medio, hemos sido prácticamente un laboratorio unido. Quería agradecerlos también a vosotros,

empezando por la monga de **Maru**, con la que me lo he pasado en grande fuera del laboratorio, enseñándome el Rabipelao y compartiendo risas, cenas y fiestas por Barcelona y fuera de ella. **Miriam** y **Arnau** por ponerme al día de APM y estar siempre dispuestos ayudarme. A **Jordi** el futuro alcalde de Collbato. **Laura**, que aunque tienes cara de carita de ángel, por dentro eres un pequeño diablillo que siempre me ayudaba en mis fechorías. **Raquel**, la currante por excelencia, me he reído mucho contigo y todas las frikadas que me has contado. Estas hecha de hierro no hay autobús que te paré ni para venir a trabajar. **Julia**, por haberme tenido que soportar que todas mis dudas de la qPCR y por traerme esos quesos tan ricos. A las jefas: **Cristina**, porque siempre has estado dispuesta ayudarme y, por qué no, a meterme un poco de caña, y a l'**Eli** per què sempre has vingut a veurem amb un hola, i encara que aparentment ens portarem com el gos i el gat, quan no estaves al laboratori et trobava a faltar.

A los del laboratorio 8, mi segunda casa, quería agradecer todos los momentos que hemos vivido dentro y fuera del departamento, y sobre todo, por el coñazo que os daba cada vez que os visitaba. Al principio con **Chus**, **Byron**, **Anna** por demostrar que siempre es buena hora para una cerveza y tener cenas que den para mucho. A **Ayalke** porque siempre está dispuesto a tomar una cerveza para desconectar y dejarnos en ridículo bailando. **Laura**, la mami, **Marta**, futura mami y al pesado de **Xavi** por esos momentos que hemos vivido, ya sea jalando una hamburguesa, una pizza o un chino. Además, Xavi que voy a decirte, aunque me pongas esos motes, que ya no hay manera de quitármelo de encima, hemos compartido cotilleos y de vez en cuando alguna discusión, porque ya sabes que aunque me encante hacerte la puñeta, cuando no estas te echo de menos. A **Tarik**, que mala suerte que tienes de ser del equipo que eres, y **Silvia**, **Carmina** y **Sandra**, gracias por haberme soportado. A los que llegaron hace poco como Eloy, gracias por recordarme la grandeza de los antiguos conquistadores. Y a mí casera **Silvia Bofill**, porque siempre me ha sacado una sonrisa cuando nos hemos visto.

A los compañeros del laboratorio 7, gracias por dejarme electroporar las veces que he querido y cerrar conmigo los ojos por si aquello petaba. **Markus**, el gran alemán, hemos tenido conversaciones de todo tipo y siempre me has ayudado y aconsejado en todo aquello

que iba a realizar. **Raquel** y **Maite** gracias por ayudarme con todas mis dudas sobre clonaciones y proteínas. Y a la última incorporación, **Elena**, porque sí sé que tengo que comer a las 4 siempre puedo ir contigo.

Y los de **fase I**, empezando el laboratorio 2: **Amanda, Susana** y **Lili**, que me habéis ayudado con todo el tema de proteínas; a los del laboratorio 4: **Llorenç, Marta, Sonia A, Sonia P, Carla, Tania** y **Mario**, siempre que ido a preguntaros dudas de protocolos me habéis ayudado; el laboratorio 5: **Quim, Marga** y **Andrés Izquierdo**, porque no han sido pocas las cervezas que hemos compartidos juntos; y a los del laboratorio 6: **Fran, Lucia, Montse, Anna, Aurora, Cristina** y **Nerea**, que siempre que os he pedido consejo, materiales os habéis ofrecido ayudarme. Porque en general por estar más lejos no significan que haya tenido menos contacto con vosotros. Muchos de vosotros me habéis ayudado cuando he ido a preguntaros dudas sin las que esta tesis no hubiera sido posible. Y con otros hemos compartido grandes momentos fuera del laboratorio en cenas y fiestas.

También agradecer a la gente de secretaria, **Macu, Susana, Bea, Rosario** y **Manolo** por estar siempre dispuestas a ayudarme, y hacer el departamento un poco más dinámico con los carnavales, rifas de navidad...

A mis diferentes compañeros de piso. Desde los 3 locos del carmel, **Arnau, Albert** y **Antonio**, que me acogieron en su casa y siempre me ayudaron en lo que necesitaba. Vivir con uno de Olot, un tarado de la montaña que quería aprehender a ir por glaciares en Youtube y el de Parets con sus espada laser, con el que llegue a compartir un master y aún no he convencido para hacer un triatlón, hicieron que cuando llegaré a casa siempre me sacaran una sonrisa. A los primero de bordeus, **Ana** y **Gorka**, no se quien tiene más peligro de los dos, pero me lo he pasado en grande con vosotros. Y a los dos últimos **Javi** y **Edu**, me habéis pillado al final de la tesis y he estado poco por casa, pero hemos compartido grandes momentos.

A mis compañeros del master, sobre todo a **Ofelia** y a **Laura**, por animarnos/consolarnos primero con el master y luego con la tesis.

A los compañeros del Tri For Fun, por haberme ayudado a desconectar con un “poco” de deporte. Sobre todo, a **Sergi, Uri** y a **Javi Izquierdo** que aparte de dejarme sin aliento corriendo, hemos compartido alguna que otra comida.

A mis amigos de Valencia, gracias a todos, **Juan, Fonsi, Jose, Valero, Tono, Joambo, Edu**, y **Taco** por esos viajes y fines de semana por Valencia, y a **Juanfran, Fran, Rezu, Javi** y **Vicente** por esas paellitas, tucanes y salidas nocturnas, porque en general aunque no tenías ni idea lo que hacía, siempre me preguntabais por mis bichitos y virus y ayudabais a desconectar cada vez que visitaba la terreta.

A mis amigos de la facultad, en especial al grupo los Toliguez: **Irure, Santi, Carlos** y **Mc Arthur**, porque gracias a vosotros el preludio de esta tesis fue irrepetible y que cada vez que nos veíamos me animabais y os preocupabais por ver cómo iba. Y por esos viajes que nos hemos marcado juntos.

A mi amigo **Gustavo**, que aunque hemos estado separos por varios kilómetros, siempre me has ayudado y preocupado por ver cómo me iba y sabía que aunque estabas lejos podía contar contigo. Gracias por escucharme los rollos que te metía de cómo me iban las cosas y por ayudarme a desconectar en las ocasiones que nos veíamos o nos tirábamos ratos al teléfono. Y por supuesto, muchas gracias también a **Diana**.

A mis iaios, **Isabel** y **Alberto**, porque aunque han sido varios años fuera, siempre me llamabais para ver cómo estaba y si mis bacterias estaban bien. Siempre habéis estado ahí, muchas gracias por cuidarme siempre.

A mis **tíos, primas** y **primos**, que aunque al venirme a Barcelona, haya acudido a menos cumpleaños o reuniones familiares siempre habéis comprendido lo que estaba haciendo y cada vez que nos hemos visto me habéis demostrado vuestro cariño.

Gracias a mi hermano, **Andreu**, que aunque nos estemos peleando siempre, cuando que te he necesitado, siempre te he tenido a mi lado y me has ayudado en lo que te he pedido. Eres el mejor hermano que se puede tener.

Y sobre todo, gracias a mis padres **Rafa** y **Marga**. Obviamente si estoy escribiendo esta tesis, la mayor parte de culpa la tenéis vosotros. Siempre me habéis apoyado en todo, me animasteis a venir a Barcelona y me enseñasteis que con esfuerzo todo es posible. Aunque muchas veces os costaba entender lo que hacía, siempre me intentabais ayudar con lo que fuera. Ambos sois muy importante en mi vida y me habéis enseñado valores fundamentales. Desde la distancia me dabais cariño y si no llega a ser por los tupperes que me mandabais no sé si hubiera sobrevivido alguna semana.





**ABREVIATURAS**

A/E	Adhesión e invasión ( <i>“Attaching and effacing”</i> )
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CG	Copias Genómicas
Da	Dalton
DIG	Digoxigenina
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGM	Elemento genético móvil
g	Gramos
GTA	“Gene transfer agent”
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
LEE	Locus of Enterocyte Effacemente
lp	<i>“Lower primer”</i>
°C	Grados Celsius
<i>p</i>	Variable de significación estadística
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>“Polimerase Chain Reaction”</i> )
qPCR	PRC cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
Saa	Adhesina autoaglutinante de STEC
ss	Cadena simple de ADN
STEC	<i>E. coli</i> productora de la Toxina Shiga
Stx1	Toxina Shiga 1
Stx2	Toxina Shiga 2
SUH	Síndrome urémico hemolítico
T	Temperatura
ufc	Unidades formadoras de colonias
ufp	Unidades formadoras de calvas



---

**CONTENIDO DE LA TESIS**

<b>Agradecimientos</b>	<b>i-viii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>ix</b>
<b>Contenido de tesis</b>	<b>xi-xii</b>
<hr/>	
<b>1. Introducción general</b>	<b>1-40</b>
<hr/>	
1.1 Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	3
1.2 <i>Escherichia coli</i>	4
1.3 <i>Escherichia coli</i> patogénicas	5
1.4 <i>Escherichia coli</i> productoras de toxina Shiga o STEC	9
1.4.1 Reservorio y mecanismos de transmisión de STEC	12
1.4.2 Problemas clínicos causados por STEC	13
1.5 Factores de virulencia de STEC	15
1.5.1 La toxina Shiga	15
1.5.2 “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE)	18
1.5.3 Otros factores de virulencia de STEC	20
1.5.4 Saa: Adhesina autoaglutinante de STEC	23
1.5.5 Movilidad de factores de virulencia en STEC	24
1.6 Bacteriófagos	26
1.6.1 Ciclos replicativos de los fagos	27
1.6.2 Ciclo lítico y lisogénico en fagos atemperados	30
1.6.3 Inducción del ciclo lítico	31
1.6.4 Transducción	33
1.7 Bacteriófagos portadores de genes de virulencia	34
1.7.1 Bacteriófagos Stx	34
1.7.2 Bacteriófagos Stx en el medio ambiente	37
1.7.3 Respuesta bacteriana al estrés ambiental	38
<b>2. Objetivos</b>	<b>41-44</b>
<hr/>	
<b>3. Publicaciones</b>	<b>45-52</b>
<hr/>	

3.1	Listado de publicaciones	47
3.2	Informe de participación en los artículos	49
3.3	Informe del factor de impacto de los artículos	51
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	<b>53-66</b>
4.1	<b>Capítulo 1: Bacteriófagos portadores de la toxina Shiga en muestras fecales humanas de individuos sanos</b>	67-70
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resumen del artículo 1</li> <li>• Artículo 1: <i>Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals</i></li> </ul>	57 63
4.2	<b>Capítulo 2: Genes efectores de tipo III y otros factores de virulencia en <i>Escherichia coli</i> productoras de la toxina Shiga aisladas en agua residual</b>	71-86
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resumen del artículo 2</li> <li>• Artículo 2: <i>Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding Escherichia coli isolated from wastewater</i></li> </ul>	73 77
4.3	<b>Capítulo 3: Movilización de <i>saa</i> en <i>E. coli</i> productoras de la toxina Shiga</b>	87-124
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resumen del artículo 3</li> <li>• Artículo 3: <i>Mobilization of saa, encoding an STEC autoagglutinating adhesin, in Shiga toxin producing Escherichia coli</i></li> </ul>	89 94
4.4	<b>Capítulo 4: Genes efectores de tipo III y otros factores de virulencia en <i>Escherichia coli</i> productoras de la toxina Shiga aisladas en agua residual</b>	125-140
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resumen del artículo 4</li> <li>• Artículo 4: <i>BaeSR, involved in envelope stress response, protects against lysogenic conversion by shiga toxin 2-encoding phages</i></li> </ul>	127 133
<b>5.</b>	<b>Discusión general</b>	<b>141-152</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>153-155</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>157-184</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos</b>	<b>185-233</b>
8.1	Anexo 1: Otras publicaciones no incluidas en la Tesis	187
8.2	Anexo 2: Composición medios de cultivo y tampones	195
8.3	Anexo3: Protocolos	205
8.4	Anexo 4: Cebadores usados en la tesis	229
8.5	Anexo 5: Plásmidos usados en la tesis	233

# **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**



## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1 Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae*, a menudo denominada enterobacterias o bacterias entéricas (del griego *enterikos*, perteneciente al intestino) (Prescott *et al.*, 2004) está formada por bacterias Gram negativas agrupadas en más de 40 géneros y 100 especies (Brenner y Falkow, 1971). Su morfología varía entre bacilos, cocos o pueden ser pleomórficas. Son bacterias anaeróbicas facultativas, puesto que son capaces de fermentar carbohidratos en condiciones anaeróbicas y oxidar una amplia gama de sustratos en condiciones aeróbicas. Por lo general son oxidasa negativas (excepto el género *Plesiomonas*), ya que carecen de citocromo oxidasa, y catalasa positivas. Son quimioheterótrofas, necesitando carbono y nitrógeno, aunque en algunos casos también vitaminas y aminoácidos. Pueden reducir el nitrato a nitrito y no tienen grandes requerimientos nutricionales. Muchos géneros tienen uno o más flagelos mientras que algunos géneros no son móviles y no forman esporas. Entre los principales géneros se encuentran: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Erwinia* y *Escherichia*.(Brenner *et al.*, 2005).

Las enterobacterias suelen hallarse en el tracto digestivo de los vertebrados, allí contribuyen a la degradación del alimento o la producción de algunos compuestos como las vitaminas. Pueden encontrarse también formando parte de la cavidad bucal, fosas nasales o vías genitourinarias. Algunas especies pueden hallarse en animales acuáticos, plantas o en el suelo. La familia *Enterobacteriaceae* incluye patógenos que causan infecciones intestinales en el ser humano como *Shigella*, *Salmonella* o *Escherichia coli* (Jarvis y Martone, 1992; Sanders y Sanders, 1997; Brenner *et al.*, 2005; Center for Disease and Control: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).



## 1.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) fue descrita en 1885 por Theodore von Escherich. Es un cocobacilo Gram negativo y anaerobio facultativo, capaz de metabolizar la glucosa y la lactosa mediante la fermentación ácido-mixta.

En el tracto gastrointestinal humano se estiman unos  $10^{14}$  microorganismos (Zhang *et al.*, 2006). *E. coli* se ha asociado a la microbiota comensal de la mayoría de los animales de sangre caliente, llegando a alcanzar el 80% de la microbiota aeróbica intestinal. No obstante, hay que considerar que las bacterias aeróbicas facultativas representan menos del 0.1% en ciertas áreas del colon (Eckburg *et al.*, 2005). *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos a las pocas horas después de nacer, tras lo cual se suele encontrar en la mucosa del colon. En el colon *E. coli* desarrolla funciones beneficiosas para el huésped, como la síntesis de factores nutricionales, la absorción de algunas vitaminas, especialmente la vitamina K o el procesamiento de residuos alimentarios, como el gluconato (Kaper *et al.*, 2004). *E. coli* es excretada, en individuos sanos, diariamente en una concentración de  $10^8$  -  $10^9$  unidades formadoras de colonias por gramo de heces (UFC/g de heces).

*E. coli* se ha convertido en un organismo modelo para estudiar la evolución del genoma bacteriano, debido a la alta diversidad genética, así como su rápida tasa de crecimiento y a tener unos requerimientos nutricionales simples. En los últimos 50 años se ha convertido en unas de las formas procariontas más estudiadas.

Serológicamente *E. coli* se clasifica por antígenos celulares: el antígeno somático O es la parte externa de los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, mientras que el antígeno H, es determinado por componentes del flagelo bacteriano. En determinadas cepas, el antígeno O se clasifica con las siglas ONT, como clasificación provisional para grupos no estandarizados. El serotipado se usa para caracterizar las cepas patógenas (Kulkarni *et al.*, 2002).

### 1.3 *Escherichia coli* patogénicas

Generalmente *E. coli* es una bacteria no patógena que tiene como nicho la capa de la mucosa del colon de los mamíferos. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* pueden adquirir genes de virulencia específicos que la convierten en un patógeno, pudiendo colonizar nuevos nichos o causar un amplio espectro de enfermedades (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004). Éstas infecciones pueden ser debidas a una cepa exógena o a una comensal, causando severas patologías intestinales y extraintestinales (infecciones urinarias, diarreas, vómitos, sepsis, etc...). La infección por *E. coli* se produce principalmente por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar, agua y zumos contaminados, carne picada y algunos vegetales no cocinados. *E. coli* representa una importante causa de mortalidad en todo el mundo, especialmente en países subdesarrollados, afectando principalmente a niños y lactantes (Bern, 2004).

Las *E. coli* patogénicas en humanos se pueden clasificar en dos tipos dependiendo de la región del cuerpo donde desarrolla la infección (Figura 1):

a) *E. coli* patogénicas que causan Infecciones en regiones extra-intestinales (ExPEC) (Russo y Johnson, 2000).

- *E. coli* uropatogenicas o **UPEC**: Causan infección en el tracto urinario.
- *E. coli* causantes de sepsis y meningitis neonatal o **NMEC**

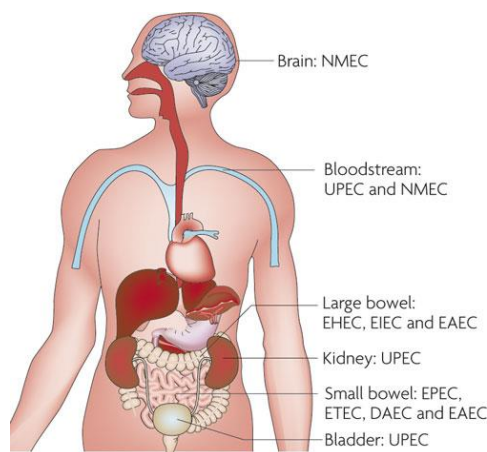


Figura 1. Regiones afectadas por *E. coli* patogénicas. (Croxen y Finlay, 2010)

b) *E. coli* patogénicas que infectan la región intestinal (InPEC), también llamadas *E. coli* diarreogénicas (Nataro y Kaper, 1998). Se clasifican en 6 subgrupos dependiendo del fenotipo, factores de virulencia y patología.

1. *E. coli* enteropatógenicas (**EPEC**), producen enteritis graves y suelen causar diarrea infantil, siendo uno de los patógenos que provoca mayores infecciones en menores de 4 años en el mundo (Lanata *et al.*, 2002). Tienen la capacidad de producir las lesiones de A/E (“*attaching and effacing*”), asociadas con la isla de patogenicidad LEE (“*Locus of enterocyte effacement*”) ( McDaniel *et al.*, 1995; Kaper *et al.*, 2004 ), dónde las bacterias se unen a la membrana de las células huésped provocando una rotura de la superficie celular y la degeneración de las microvellosidades del intestino. Tras la adhesión de la bacteria al enterocito, gracias a una proteína llamada intimina, codificada por el gen *eae* (Ochoa y Contreras 2011), se produce una acumulación de actina en la región apical de la célula intestinal, formando una estructura de pedestal. La respuesta inflamatoria y cambios en la permeabilidad de la célula intestinal, junto con la secreción de electrolitos y la reorganización del citoesqueleto, provocan los cambios fisiológicos responsables de la diarrea acuosa característica de esta infección (Celli *et al.*, 2000).

2. *E. coli* enteroinvasivas (**EIEC**), causan varios grados de disentería, que se caracteriza por fiebre, calambres abdominales y diarrea que contiene sangre y mucosidad (Kaper *et al.*, 2004), afectando tanto a niños como adultos. Su mecanismo de infección es similar al de *Shigella spp*, siendo un patógeno intracelular obligado, a diferencia del resto de *E. coli* diarreogénicas (Figura 2). La bacteria, tras la adhesión, penetra la célula epitelial, a continuación lisa la vacuola de endocitosis y comienza la multiplicación intracelular y los movimientos a través del citoplasma, migrando a células adyacentes (Sansoneetti, 2002).

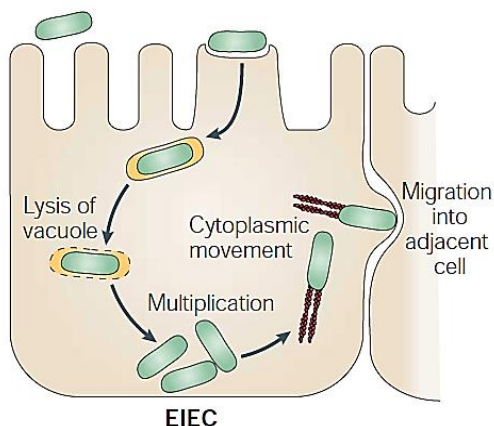


Figura 2. Mecanismo de infección de EIEC (Kaper *et al.*, 2004)

3. *E. coli* enterotoxigénicas (**ETEC**), causan enteritis y diarrea profusa. Provocan la mayoría de las diarreas infantiles en el mundo desarrollado y la causa más común de la conocida como diarrea del viajero (Nataro y Kaper 1998). Colonizan la superficie de la mucosa del intestino mediante fimbrias o fibrillas de origen proteico y excretan dos tipos de enterotoxinas: la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST). Estas toxinas provocan un aumento del nivel intracelular de AMPc (LT) y GMPc (ST) (Figura 3a), provocando la salida de iones  $\text{Cl}^-$  de la célula, teniendo como consecuencia diarrea acuosa (Kaper *et al.*, 2004; Croxen y Finlay 2010).

4. *E. coli* enteroagregativas (EAEC o **EAggEC**), son la segunda causa más común de la diarrea del viajero en el mundo. La diarrea suele ser acuosa, pero a veces puede ir acompañada de sangre o mocos. La característica fenotípica de las EAggEC es su adhesión agregativa (Figura 3b), llevada a cabo mediante unas determinadas fimbrias, conocidas como adhesinas fimbriales agregativas (AFFS) (Czeczulin *et al.*, 1997), siendo similares a la familia de adhesinas Dr. Sin embargo, no se encuentran en todas las cepas de EAggEC, y se ha descrito que aquellas que no poseen AFFS, secretan un proteína llamada dispersina (Velarde *et al.*, 2007). Los genes que participan en la agregación se localizan en una familia de plásmidos virulentos, conocidos como plásmidos pAA. Además las EAggEC también producen diferentes toxinas como Pic, con actividad mucinasa; la toxina termoestable (ST) de *E. coli* enteroagregativa (EAST1), similar a la toxina ST de las ETEC y que contribuye a la diarrea

acuosa; o la toxina Pet, que provoca cambio en el citoesqueleto y la rotura de la proteína espectrina del citoesqueleto (Kaper *et al.*, 2004; Croxen y Finlay 2010).

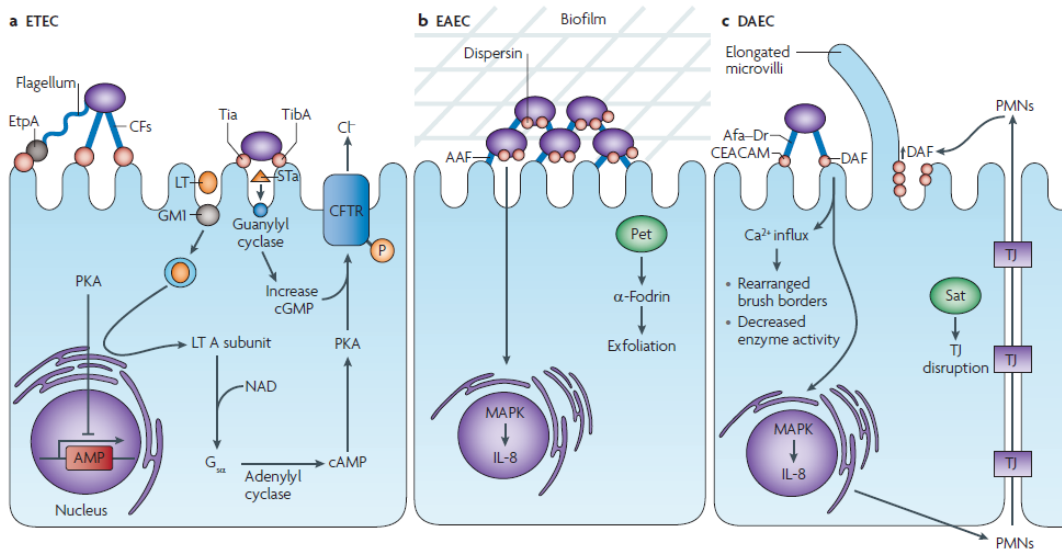


Figura 3. Mecanismo de infección ETEC, EAEC y DAEC (Croxen y Finlay, 2010)

5. *E. coli* enterohemorrágicas (**EHEC**), producen desde diarreas o colitis hemorrágicas (diarrea con sangre) hasta producir complicaciones graves como el síndrome urémico hemolítico (SUH) o la púrpura trombocitopenica trombótica (PTT). El serotipo más característico es el O157:H7, que ha causado brotes en Norte América, Japón y algunas regiones de Europa (Croxen y Finlay 2010), siendo los primeros brotes causados por el consumo de hamburguesas poco cocinadas. El principal reservorio de las EHEC, es el tracto intestinal del ganado bovino con una dosis infectiva requerida para que se lleve a cabo la infección extremadamente baja (< 100 células) (Kaper *et al.*, 2004).

El principal factor de virulencia de las EHEC es la toxina Shiga (Stx), cuyo gen está localizado en el genoma de un bacteriófago atemperado. Además poseen numerosos factores de virulencia, como los codificados en el plásmido pO157 (Schmidt *et al.*, 1995), que codifica para la hemolisina, o los localizados en la isla de patogenicidad LEE (adhesinas, sistema de secreción tipo III...) que son homólogos a las producidas por las EPEC.

6. *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), pueden producir diarrea acuosa, no obstante, se han aislado en pacientes sin diarrea. Afecta particularmente a niños mayores de 12 meses hasta los 5 años de edad (Nataro y Kaper 1998; Scaletsky *et al.*, 2002), y en adultos pueden producir infecciones en el tracto intestinal (Servin, 2005). Aproximadamente el 75% de las cepas DAEC, producen un tipo de fimbria de adhesión, F1845 (Bilge *et al.*, 1989; Kaper *et al.*, 2004), y una adhesina afimbrial (Afa), denominada Afa-Dr adhesina (Servin, 2005). Afa-Dr se une a unos receptores de membrana del intestino, denominados factor acelerador de la degradación (DAF). Dicha unión provoca la agregación de las moléculas de DAF, desencadenando unas cascadas dependientes de  $Ca^{2+}$ , que tiene entre otros efectos la elongación de la superficie del microvilli, que protege a las bacterias (Figura 3c), de ahí su característica de adhesión difusa (Croxen y Finlay 2010).

Otras clasificaciones de *E. coli* están basadas en propiedades filogenéticas, el origen de aislamiento, como aislados ambientales o *E. coli* patogénicas de ave (APEC), o en la capacidad de poseer un factor de virulencia específico, como por ejemplo, *E. coli* productoras de Stx (STEC).

#### **1.4 *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga o STEC**

En 1977 se describió por primera vez que ciertas cepas de *E. coli* enteropatogénicas eran capaces de producir una toxina con efecto citopático sobre la línea celular Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977). Esto dio lugar al término “*E. coli* Verotoxigénicas” o “*E. coli* productoras de la citotoxina Vero” (VTEC). En 1982 se purificó y caracterizó la toxina a partir de los aislados del grupo Konowalchuk (O’Brien *et al.*, 1982) y se demostró que poseían unas características similares a las de la toxina producida por *Shigella dysenteriae* serotipo I, que había sido descrita en el año 1898 por Kiyoshi Shiga (Trofa *et al.*, 1999). A partir de entonces apareció el término “*E. coli* productora de la toxina Shiga-like o simplemente toxina Shiga (STEC) y han sido utilizados indistintamente en la literatura las siglas VTEC y STEC para designar a las *E. coli* que poseen uno o más genes de la familia *stx* (Kaper *et al.*, 2004).

Dentro de los patógenos transmitidos por alimentos, la incidencia de las STEC a nivel de la Unión Europea (EU) está por detrás de *Campylobacter* y *Salmonella* (EFSA y ECDC, 2013). Sin embargo en términos de peligrosidad, es el más peligroso de los tres (Chagnot *et al.*, 2014). Actualmente se han descrito más de 400 serotipos diferentes de *E. coli* que portan genes *stx*, y muchos de ellos han sido implicados con enfermedades en seres humanos (Blanco *et al.*, 2004; Mathusa *et al.*, 2010), siendo los serotipos de EHEC, especialmente las cepas O157:H7, los que presentan una dosis mínima infecciosa menor (de 10 a 100 células) (Willshaw *et al.*, 1994). Sin embargo, algunos serotipos de STEC aislados de ganado o de alimentos, raramente han sido asociados con enfermedades en humanos (Karmali *et al.*, 2003). Los serotipos no-O157 que causan un mayor número de infecciones son: O26, O45, O103, O111, O121 y O145 (USDA-FSIS, 2011), y tras el brote de 2011 en Alemania, la cepa O104 causante del brote ha sido incorporado a este grupo de cepas no-O157 peligrosas (Chagnot *et al.*, 2014).

En el 2011 se produjo en Alemania el mayor brote hasta ahora reportado producido por STEC, concretamente por la cepa del serotipo O104:H4. Se confirmaron un total de 3842 casos, de los cuales hubieron 855 casos de SUH, con un total de 35 muertes (Muniesa *et al.*, 2012; Robert Koch Institut, 2011). La cepa O104:H4 afectó a ciudadanos de otros países que viajaron a Alemania y también causó un brote de menores dimensiones en Francia (King *et al.*, 2012). Basándose en datos epidemiológicos, se determinó que el brote se produjo por el consumo de brotes de fenogreco germinados a partir de semillas contaminadas provenientes de Egipto. Sin embargo, en las mezclas de brotes analizadas no se obtuvo ningún positivo para O104:H4 (Muniesa *et al.*, 2012). O104:H4 pertenece al grupo de las EAggEC con los genes característicos de este grupo como *AggR*, regulador transcripcional *AggR*, *pic*, proteína encargada de la colonización intestinal o *set1*, enterotoxina 1 de *Shigella*. Sin embargo, ha perdido el plásmido AAF/III de adhesión y la proteína termoestable *astA*. La característica de esta enteroagregativa es que tiene genes característicos de las STEC: *stx<sub>2a</sub>*, fimbria larga polar (LPF) (*lpfA<sub>026</sub>* y *lpfA<sub>0113</sub>*), resistencia al telurito (*ter*), componentes del sistema de secuestro de hierro (*irp2* y *fyuA*), y además han adquirido plásmidos con genes de resistencia a antibióticos como *bla<sub>TEM-1</sub>* y *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (Bielaszewska *et al.*, 2011) (Figura 4). La cepa adquirió

un fago Stx que le otorgó la capacidad de producir la toxina. Este fago Stx parece estar relacionado con un fago Stx de la cepa *E. coli* O111 (Laing *et al.*, 2012) y estudios recientes indican que es relativamente similar al de otros fagos Stx encontrados en cepas STEC, que fueron aisladas de ganado en Alemania (Beutin *et al.*, 2014). No obstante el origen del fago y el momento de la incorporación del fago en la cepa todavía es desconocida.

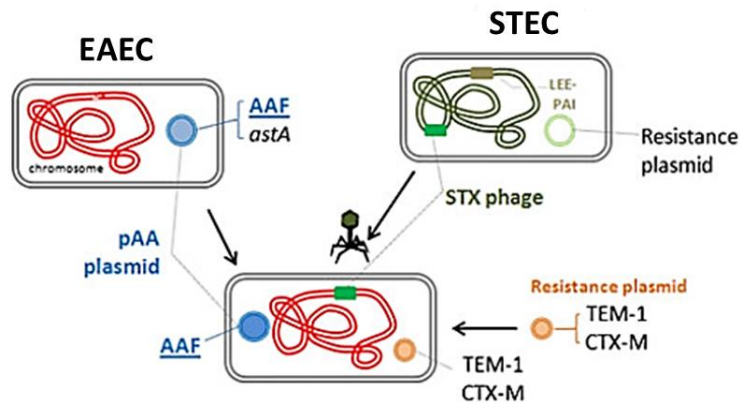


Figura 4. Origen de la cepa O104:H4 patógena (Modificado de Brzuszkiewicz *et al.*, 2011)

Algunos autores han clasificado la cepa O104:H4 alemana como un nuevo patotipo, *Escherichia coli* enteroagregativa-hemorrágica (EAHEC) (Brzuszkiewicz *et al.*, 2011), aunque la teoría actualmente aceptada (Franz *et al.*, 2014) es que *E. coli* posee un núcleo genómico (alrededor de 2200 genes) que es común en todas las *E. coli*, y que cada cepa adquiere un “genoma accesorio”. La integración de bacteriófagos, adquisición de islas de patogenicidad y la transferencia horizontal de genes dan como resultado un mosaico en la estructura del genoma de *E. coli* (Escobar-Páramo *et al.*, 2004). Esto genera que *E. coli* tenga un genoma altamente flexible y dinámico con numerosas oportunidades para que aparezcan nuevos tipos. (Franz *et al.*, 2014) (Figura 5).



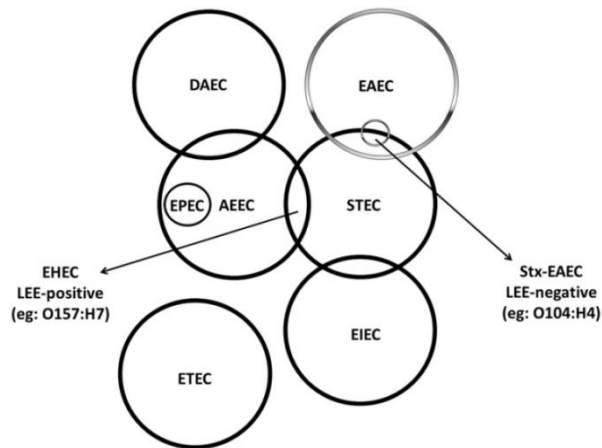


Figura 5. Relación entre las *E. coli* patógenas humanas, (Franz *et al.*, 2014)

#### 1.4.1 Reservorios y mecanismo de transmisión de STEC

STEC pueden encontrarse en el intestino de numerosas especies pero los rumiantes son el principal reservorio, siendo el ganado bovino donde se encuentra la mayor fuente de infección para los humanos (Caprioli *et al.*, 2005). Particularmente en los terneros se encuentra mayor cantidad de STEC, que en los adultos (Cray y Moon, 1995). La prevalencia en el ganado está fuertemente asociada con la presencia de bacterias STEC en el agua y en el entorno ambiental (Renter *et al.*, 2005). Se ha detectado la presencia de STEC también en ganado ovino y en otros mamíferos no rumiantes como caballos y perros e incluso aves, como las gaviotas. Los animales suelen ser portadores asintomáticos (Caprioli *et al.*, 2005). Los productos lácteos también se han descrito como vías de transmisión, siendo la leche sin pasteurizar una causa importante de infección.

Además, las frutas y vegetales como lechuga, col, espinacas, rábanos, pepinos o brotes vegetales, han sido asociados a brotes causados por STEC. Debido a la capacidad de *E. coli* O157:H7 de sobrevivir a pH bajo se ha asociado también a productos ácidos, como embutidos fermentados, mayonesa y zumo de fruta sin pasteurizar. La contaminación de STEC en los vegetales puede producirse por diferentes vías: a través del abono aplicado en los campos, agua contaminada fecalmente utilizada para el riego o higiene inadecuada de los aparatos de procesamiento (*E. coli* O157:H7 puede sobrevivir largos periodos en plástico y acero inoxidable), o de las personas que los manipulan.

Otra vías de transmisión de STEC es por el agua, ya sea por el uso de aguas recreacionales contaminadas, usadas en campos de cultivo o por la ingestión de agua potable contaminada que no haya sido sometida a un proceso de cloración. La transmisión entre personas de STEC se ha descrito principalmente en guarderías y hospitales principalmente, pero también de animales a personas en visitas a los parques zoológicos y las granjas (Range *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 Problemas clínicos causados por STEC

Los síntomas producidos por una infección por STEC incluyen dolores abdominales y diarrea que puede llegar a ser una colitis hemorrágica en el 90% de los casos (Riley *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 1984; Karmali *et al.*, 2003). Los primeros síntomas son la aparición de sangre en heces, irritabilidad, en ocasiones fiebre, vómitos y cansancio (Figura 6). Más tarde tienen lugar los moratones, inconsciencia, palidez, epilepsia y problemas de riñón irreversible, llegando incluso a causar la muerte. En el caso de los niños, un 15% de ellos puede llegar a desarrollar el síndrome urémico hemolítico (SUH), que afecta principalmente a niños y ancianos.

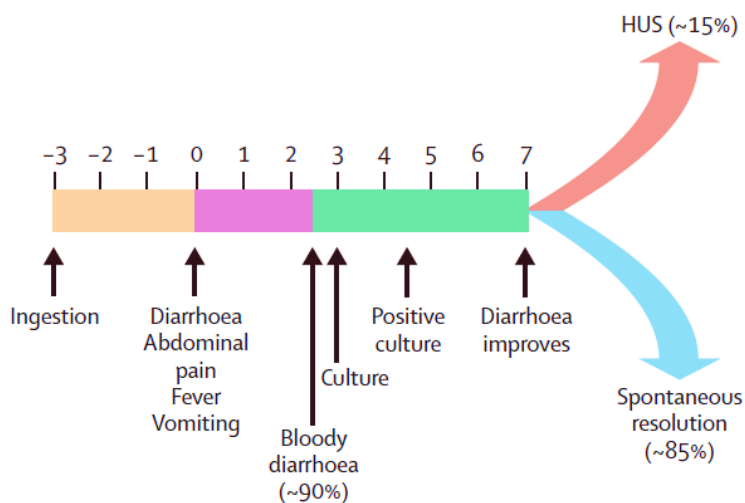


Figura 6. Progresión de *E. coli* 0157:H7 en niños. (Tarr *et al.*, 2005)

El SUH se caracteriza por la insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia. Aunque la mayor incidencia del SUH causado por STEC se da en niños y ancianos, en algunos brotes, como el ocurrido en Alemania con la cepa O104:H4, la mayoría de los pacientes fueron mayores de 20 años (Frank *et al.*, 2011). El uso de antibióticos puede incrementar el riesgo de SUH en adultos. Esto parece ser debido a que los antibióticos favorecen la liberación de la Stx al lisarse la bacteria y a que inducen los bacteriófagos portadores del gen *stx*, y por lo tanto, dando lugar a un aumento de la producción de la toxina, como se describe más adelante (Grif *et al.*, 1998; Kimmitt *et al.*, 2000; Dundas *et al.*, 2001).

La infección producida por STEC puede causar una variante del SUH, que es conocida como púrpura trombótica trombocitopénica (PTT). A diferencia del SUH los pacientes con PTT tienen fiebres más frecuentes y complicaciones neurológicas remarcables. Se debe a un trastorno de la sangre que provoca la formación de coágulos de sangre en pequeños vasos sanguíneos alrededor del cuerpo, llevando además a un número bajo de plaquetas circulantes (Paton y Paton, 1998; Tarr *et al.*, 2005).

Los países en los cuales hay una mayor incidencia de las infecciones por STEC, sobretodo O157:H7, son Nueva Zelanda, Argentina y EE.UU (Figura 7). Se cree que es debido a sus hábitos alimenticios tales como el consumo de cantidades abundantes de carne en el caso de Argentina o el abuso de la comida “fast-food” en EEUU. Sin embargo, en los últimos años están proliferando las infecciones asociadas al consumo de vegetales, y sobre todo de brotes vegetales. Por ejemplo, en el año 2014 hubo un brote debido al consumo de brotes de trébol, afectando a 19 personas, en EEUU, o el consumo de espinacas o mezclas de ensalada en 2013 y 2014, afectando a un total 66 personas, también en EEUU.

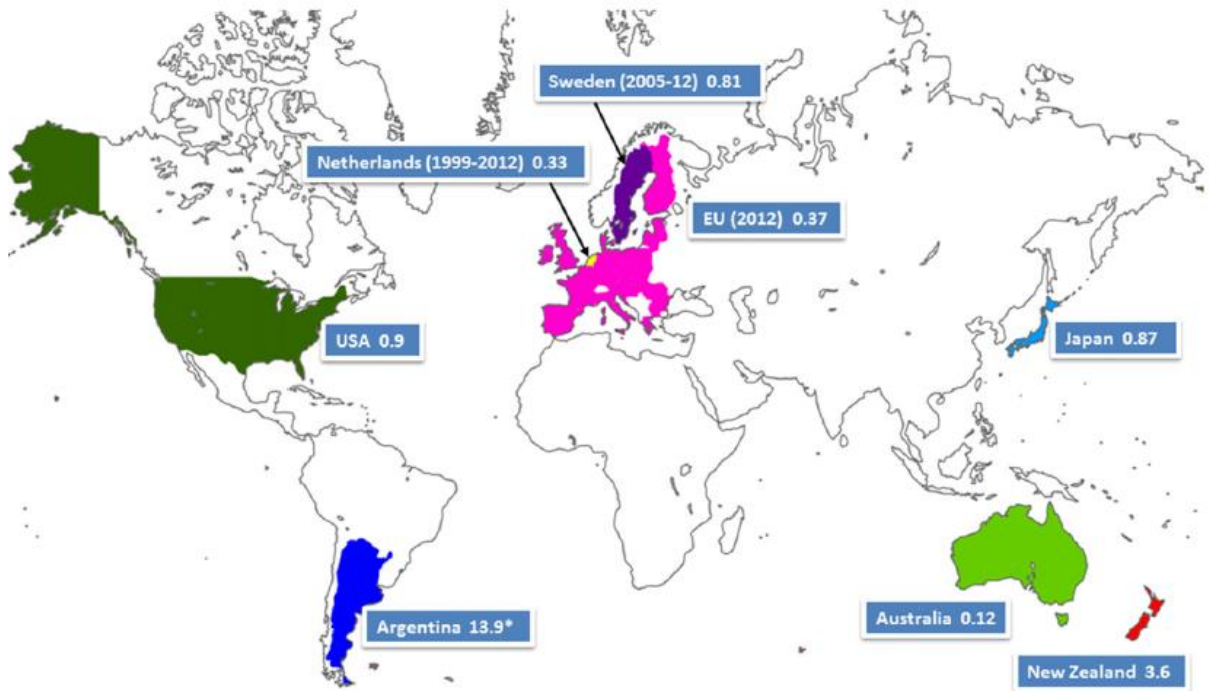


Figura 7. Incidencia anual de *E. coli* O157 por cada 100.000 habitantes (Franz *et al.*, 2014)

## 1.5 Factores de virulencia de STEC

El principal factor de virulencia que caracteriza las cepas STEC es la toxina Shiga (Stx). Sin embargo, estas cepas presentan una amplia variedad de factores de virulencia, algunos de ellos desconocidos, que permiten a las bacterias colonizar e invadir las células eucariotas, aumentando la capacidad de algunos serotipos de causar enfermedades en humanos (Boerlin *et al.*, 1999; Kaper *et al.*, 2004).

### 1.5.1 La toxina Shiga

Existen dos tipos principales de toxinas Shiga (**Stx**): La Stx1 y la Stx2, y los genes de ambas toxinas están localizados en el genoma de bacteriófagos atemperados. Estas son estructural y funcionalmente similares a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo I. La Stx1 es

prácticamente idéntica y presenta sólo un aminoácido de diferencia (Calderwood *et al.*, 1987). Sin embargo sólo hay un 58% de homología aminoacídica entre la Stx2 de *E. coli* y su homólogo en *Shigella dysenteriae*. La Stx es un tipo de holotoxina de tipo AB<sub>5</sub>, formada por una subunidad A de 32 kDa, siendo la parte catalítica de la toxina, y cinco subunidades B de 7,7 kDa, que son las responsables de la unión a los receptores de la superficie de la célula eucariota (Fraser *et al.*, 2004; Stearns-Kurosawa *et al.*, 2010).

La conformación espacial y la tasa de disociación entre la toxina y los glicolípidos es diferente entre las dos toxinas (Nakajima *et al.*, 2001). Se ha demostrado que el daño celular producido por la Stx2 es mayor que por la Stx1, causando, a dosis menores, mayor mortalidad y daños hepáticos (Figura 8). Asimismo, la Stx2 está más asociada a enfermedades graves en humanos (Boerlin *et al.*, 1999). Sin embargo el daño causado por la Stx1 es más rápido (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2010).

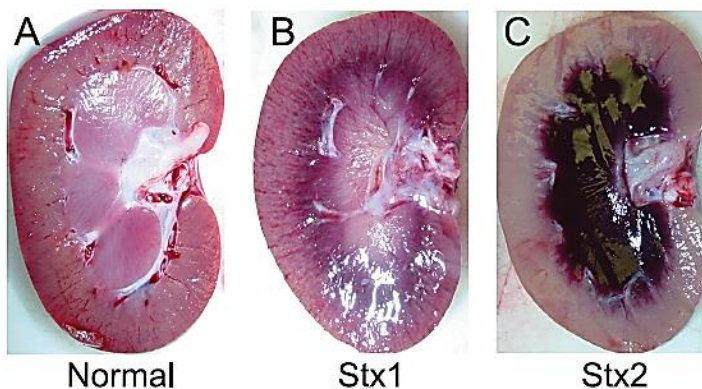


Figura 8. Daños en el riñón producidos en un primate no humano, tras la administración de la misma dosis de diferente toxina Stx (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2010).

Actualmente existen 3 subtipos de Stx1: Sxt1a, Stx1c y Stx1d, que tienen una homología del 96%. De la Stx2 se han descrito hasta el momento 7 subtipos: Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g, con una homología en la secuencia del 84%, exceptuando el clúster Stx2a, Stx2c y Stx2d que son muy similares (Scheutz *et al.*, 2012). Cada subtipo puede tener una o varias variantes, dependiendo si hay 1 o más aminoácidos de diferencia en la secuencia aminoacídica. Dentro de la Stx2a podemos encontrar 21 variantes, como por

ejemplo, Stx2a-O113-CL-3 y Stx2a-O157-A397 atendiendo al serotipo y la cepa de origen. Hay subtipos que están más asociados a SUH, como el Stx2a y Stx2c; otros subtipos producen efectos más leves como la Stx1a y Stx2g y hay un subtipo no asociado a enfermedades en humanos, como el subtipo Stx2e, que , causa edema en lechones (Friedrich *et al.*, 2002; Bielaszewska *et al.*, 2006; Persson *et al.*, 2007).

El receptor principal de Stx es el glicoesfingolípido llamado globotriasolceramida o Gb3 (CD77), que se encuentra en la membrana de las células, La excepción es el subtipo Stx2e, que se une al glicoesfingolípido globotetraoscilceramida (Gb4), ya que posee una terminación adicional que le permite unirse a residuos  $\beta(1-3)$  N-acetilgalactosamina (Johannes y Römer, 2010).

La toxina Stx entra en el tracto intestinal a través de las células intestinales. Por un lado actúa sobre los glóbulos blancos de la submucosa, provocando una reacción inflamatoria y un incremento de la expresión del receptor, y por otro lado se une a los receptores (Gb3) del tejido endotelial. De tal forma que la subunidad StxB una vez unida, induce una invaginación en la membrana que producirá que la toxina se endocite al interior celular. La toxina puede evitar la endocitosis y ser transferida a la red trans-Golgi (TGN) directamente. A continuación pasará al retículo endoplasmático y finalmente se liberará la subunidad Stx-A al citosol (Figura 9). Los péptidos de la subunidad A poseen actividad N-glicosidasa y escinden un residuo de purina de ARNr 28S, alterando la función de los ribosomas, inhibiendo así la síntesis de proteínas (O'Loughlin y Robins-Browne, 2001; Johannes y Römer, 2010; Tesh, 2010). Además se inducen cascadas enzimáticas que conducen a la apoptosis celular.

La toxina Stx puede viajar por la sangre y ser transportada hasta los riñones. En la superficie de las células renales hay una mayor cantidad de receptores Gb3 (Hughes, 2002), por lo que hará que la toxina Stx tenga mayor afinidad. En el riñón provocará los mismos procesos celulares anteriormente descritos, con lo que se observará en el paciente una insuficiencia renal aguda y destrucción glomerular, así como la anemia y la trombocitopenia típicas del SUH, (Paton y Paton, 1998).

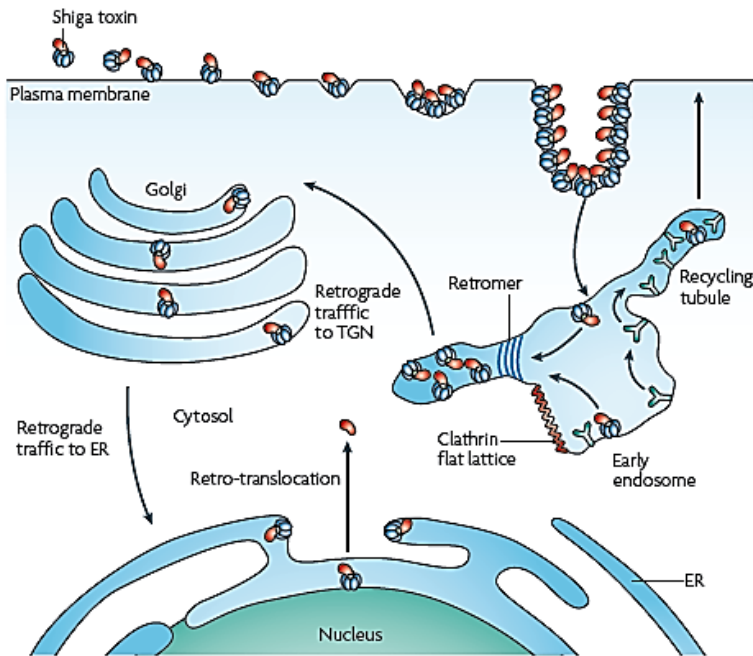


Figura 9. Mecanismo de unión y acción de las toxinas Stx (Johannes y Römer, 2010)

### 1.5.2 “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE)

LEE se encuentra caracterizada dentro de una isla de patogenicidad y comprende una serie de genes necesarios para llevar a cabo las lesiones de “attaching and effacing (A/E) o adhesión y borrado de los enterocitos. Estas lesiones se producen tras la adhesión íntima de la bacteria a la membrana del enterocito, produciendo cambios en el citoesqueleto, se forma el pedestal y la bacteria acumula la actina polimerizada en el polo apical, provocando la eliminación de las microvellosidades.

LEE se divide en tres partes: el sistema transportador de proteínas efectoras, las proteínas que llevan a cabo las funciones de adhesión y las proteínas efectoras. La regulación génica de LEE depende de diferentes factores como el “*quorum sensing*”, la acción de diversos reguladores, como los genes *Ler*, o las condiciones ambientales (Kaper *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2005).

- El sistema de secreción tipo III (**SST3**) es el encargado de transportar las proteínas efectoras desde la bacteria a la célula huésped. Dicho sistema está asociado con la virulencia de muchas bacterias Gram negativas, que infectan a humanos, animales y plantas, y está formado por aproximadamente 20 genes. Además consta de una serie de chaperonas necesarias para que las proteínas efectoras sean eficientes, puedan reconocer su sustrato, no pierdan estabilidad o sean secretadas eficientemente (Garmendia *et al.*, 2005).
- El gen encargado de la unión del patógeno a la célula intestinal es una intimina codificada por el gen *eae*. Es una proteína de membrana externa de la que se han descrito hasta 21 variantes. Para que se produzca la unión es necesario su receptor *Tir* (“*translocated intimin receptor*”). *Tir*, codificado en LEE, es transcrito y secretado por el SST3 hasta la célula eucariota, se moviliza hasta su membrana, donde hará de receptor para la intimina. Produciendo, a continuación de la unión, la proliferación de la actina y formación del pedestal. ( McDaniel *et al.*, 1995; Elliott *et al.*, 1998; Kaper *et al.*, 2004;). Para confirmar una infección causada por EHEC, el CDC recomienda que junto a la detección de los genes *stx*, se detecte la presencia del gen *eae*.

Dentro de LEE se encuentran codificadas 6 proteínas efectoras, además de *Tir*, que son secretas por SST3 causando cada una de ellas diferentes efectos (tabla 1).



Tabla 1. Proteínas efectora codificadas en LEE

Proteína efectora	Función
Map	Interfiere en el potencial de membrana de la mitocondria, y en la disrupción de las uniones de la célula eucariota.
EspB	Modula el citoesqueleto, reduciendo el número de fibras de estrés.
EspF	Interfiere en el potencial de membrana de la mitocondria, disrupción de las uniones de la célula eucariota e induce la muerte celular.
EspG	Destruye del microtúbulo por debajo del lugar de unión de la bacteria.
EspH	Modula los filamentos de actina del citoesqueleto, afectando a los filopodios y al pedestal
EspZ	Regula la acción de proteínas efectoras

### 1.5.3 Otros factores de virulencia de STEC

Otros factores de virulencia se encuentran codificados en el cromosoma bacteriano o en elementos genéticos móviles de algunas cepas, ya sea en otras islas de patogenicidad, plásmidos o en bacteriófagos atemperados. Se pueden dividir en 6 grupos: fimbrias, proteasas, toxinas, factores necrotizantes, adhesinas no fimbriales y proteínas efectoras.

- Fimbrias: Se han descrito diferentes tipos fimbriales en *E. coli* que ayudan a la colonización de la célula eucariota. Dentro de las STEC podemos encontrar 6 tipos diferentes principales: fimbrias largas polares (**LpF**), pili de EHEC (**HCP**) que es un pili de tipo 4, el pili común de *E. coli* (**ECP**), fimbrias **F9**, fimbrias de *E. coli* de unión a laminina (**ELF**) y las fimbrias que fermentan el sorbitol (**Sfp**) codificadas en un plásmido. (Farfan y Torres, 2012).

- **Toxinas:** Además de la Stx, las cepas STEC codifican diferentes toxinas, como la enterohemolisina (**hlyA**), codificada en el plásmido pO157, que actúa lisando los grupos hemo de los enterocitos reteniendo el hierro. También pueden producir la “*Cytolethal disting toxin*” (**Cdt**), de la que existen 5 variantes y puede estar codificada en fagos o en plásmidos. Actúa bloqueando el ciclo celular, provocando un alargamiento de las células y al final la muerte celular (Smith y Bayles, 2006). Otras dos toxinas que pueden ser secretadas son la toxina enteroagregativa termoestable (**EAST1**) y la citotoxina subtilasa (**SubAB**), codificada en el plásmido pO113 que se encuentra en cepas LEE negativas. La subtilasa provoca una respuesta de estrés en el retículo endoplasmático, dando lugar a la muerte celular (Wang *et al.*, 2007; Yahiro *et al.*, 2011).
- **Factores necrotizantes:** Se han descrito que las cepas de *E. coli* pueden producir dos tipos de factores necrotizantes: **CNF1** y **CNF2**. Estos factores se caracterizan por provocar el alargamiento y la multinucleación (Orden *et al.*, 1999; De Rycke *et al.*, 1990). Se ha observado que causan necrosis en la piel del conejo y son letales en el ratón. Se ha descrito un tercer tipo, **CNF3**, que parece que es patógeno en humanos (Orden *et al.*, 2007). Las *E. coli* que presentan estos factores también se denominan NTEC, y se ha observado la presencia de estos factores en cepas STEC.
- **Proteasas:** Se han descrito diferentes proteasas como la serin proteasa (**EspP**), que inhibe el factor de coagulación V evitando que se tenga la hemorragia, la catalasa/peroxidasa (**KatP**) o las metaloproteasas (**StcE**).
- **Adhesinas no fimbriales:** Podemos encontrar el gen **saa**, (será explicado más adelante), que está codificado en cepas LEE negativas. El factor inhibidor del ciclo celular (**Cif**), que es una proteína efectora tipo III que aparte de bloquear el ciclo celular, induce la formación de fibras de estrés para una adhesión focal (Marchès *et al.*, 2003). También pueden participar en el proceso de adhesión **Omp**, el factor **EfaI** característico de EHEC, el autotransportador STEC formador de biofilms (**Sab**) o la proteína homóloga del antígeno 43 de unión a calcio (**Cah**)(Farfan y Torres, 2012). Incluso se ha descrito que el

LPS o el flagelo tipo H7, pueden contribuir a la adhesión (Paton y Paton, 1998; Erdem *et al.*, 2007).

- Proteínas efectoras: Además existen toda una serie de proteínas efectoras que son secretadas por el SSTIII, que serán tratadas en este trabajo y que están resumidas en la tabla 2.

Tabla 2. Proteínas efectoras vía sistema de secreción tipo III no LEE

Proteína	Función
EspJ	Inhibir de la fagocitosis por macrófagos (Marchès <i>et al.</i> , 2008).
EspK	Mejorar la colonización intestinal (Vlisidou <i>et al.</i> , 2006).
EspM	Inducir la formación de fibras de estrés tras la infección de las células huésped y altera la arquitectura de la monocapa epitelial (Simovitch <i>et al.</i> , 2010).
NleA	Inhibir la secreción proteica de la célula (Kim <i>et al.</i> , 2007).
NleB1/NleB2	Suprimir el sistema inmune bloqueando la vía NF-kB (Newton <i>et al.</i> , 2010).
NleC, NleD	Suprimir el sistema inmune y la respuesta inflamatoria bloqueando las vías NF-kB y JNK (Baruch <i>et al.</i> , 2011; Pearson <i>et al.</i> , 2011).
NleE	Inhibir la respuesta inmune vía NF-kB (Newton <i>et al.</i> , 2010).
NleF	Facilitar la colonización intestinal (Echtenkamp <i>et al.</i> , 2008).
NleG2	Inhibir la respuesta inmune bloqueando las proteínas encargadas de la degradación de la respuesta inmune (Wu <i>et al.</i> , 2010).
NleH1-1 NleH1-2	Inhibir la respuesta inmune del hospedador vía NF-kB bloqueando sus interacciones con promotores de EHEC (Baruch <i>et al.</i> , 2011).
Tccp	Modular la producción de actina en el citoesqueleto de la célula para inducir el fenómeno de A/E y la formación del pedestal (Garmendia <i>et al.</i> , 2004).

#### 1.5.4 Saa: Adhesina autoglutinante de STEC

La capacidad de las cepas STEC de adherirse a la mucosa intestinal contribuye a la patogenicidad de estas cepas en los humanos. La mayoría de las cepas de STEC poseen la isla de patogenicidad LEE mediante la que realizan el fenómeno de A/E. Sin embargo, se ha observado que LEE no es necesario para que las cepas STEC sean patógenas. Se han descrito diferentes casos de SUH producidos por cepas LEE negativas (Paton y Paton, 1998). En un brote ocurrido en Australia (Paton *et al.*, 1999) se detectó una nueva proteína que codifica para una adhesina autoaglutinante, denominada adhesina autoaglutinante de STEC o **Saa**. Saa es una proteína que se localiza en la superficie de la membrana externa para estar expuesta a la superficie de la célula eucariota. Se ha descrito en un estudio que se encuentra codificada dentro del megaplásmido pO113 (Paton *et al.*, 2001)

El gen *saa* codifica para una proteína que varía entre 460 y 534 aminoácidos. La proteína varía su tamaño en función de la variación del número de copias en el extremo de C-terminal. Puede poseer hasta 6 repeticiones de la misma región, codificando cada repetición para 37 aminoácidos, por lo que se han descrito hasta 6 variantes de *saa*, siendo la variante 2 la más predominante en cepas aisladas de muestras de vaca y carne (Lucchesi *et al.*, 2006; Toma *et al.*, 2008). No hay relación entre el número de repeticiones y la capacidad de infección (Toma *et al.*, 2008). Se ha predicho que estas repeticiones podrían formar una estructura superenrollada ("*coiled-coil*"), que frecuentemente está implicada en las interacciones entre proteínas y podría formar multímeros (Paton *et al.*, 2001). El mecanismo por el cual se adhiere a las células eucariotas todavía no se conoce.

El gen *saa* siempre se detecta asociado con *stx* y la enterohemolisina codificada por *ehxA* (Paton *et al.*, 2001; Brusa *et al.*, 2012). La presencia de *saa*, se detecta en un porcentaje elevado, llegando al 91% (Wu *et al.*, 2010), en cepas STEC de origen bovino (Jenkins *et al.*, 2003; Lucchesi *et al.*, 2006; Brusa *et al.*, 2012). Así mismo, se ha detectado en muestra de pacientes con SUH y en pacientes con diarrea (Jenkins *et al.*, 2003).

### 1.5.5 Movilidad de factores de virulencia en STEC

Los elementos genéticos móviles (EGM) son segmentos de ADN que pueden movilizarse dentro del genoma bacteriano (movilidad intracelular) o entre bacterias (movilidad intercelular) (Frost *et al.*, 2005). Estos elementos son una fuente de genes de diferentes orígenes, que actúan como vectores de la transmisión horizontal entre cepas. Provocan la pérdida o la adquisición de genes y producen cambios genéticos por inserción, pérdida o translocación, por lo que cepas no patógenas pasen a serlo. Por ejemplo, a partir de una EPEC, tras la adquisición de varios elementos genéticos móviles, como bacteriófagos, islas de patogenicidad y plásmidos, principalmente, se formó el serotipo más virulento de las EHEC, O157:H7 (Figura 10) (Law, 2000).

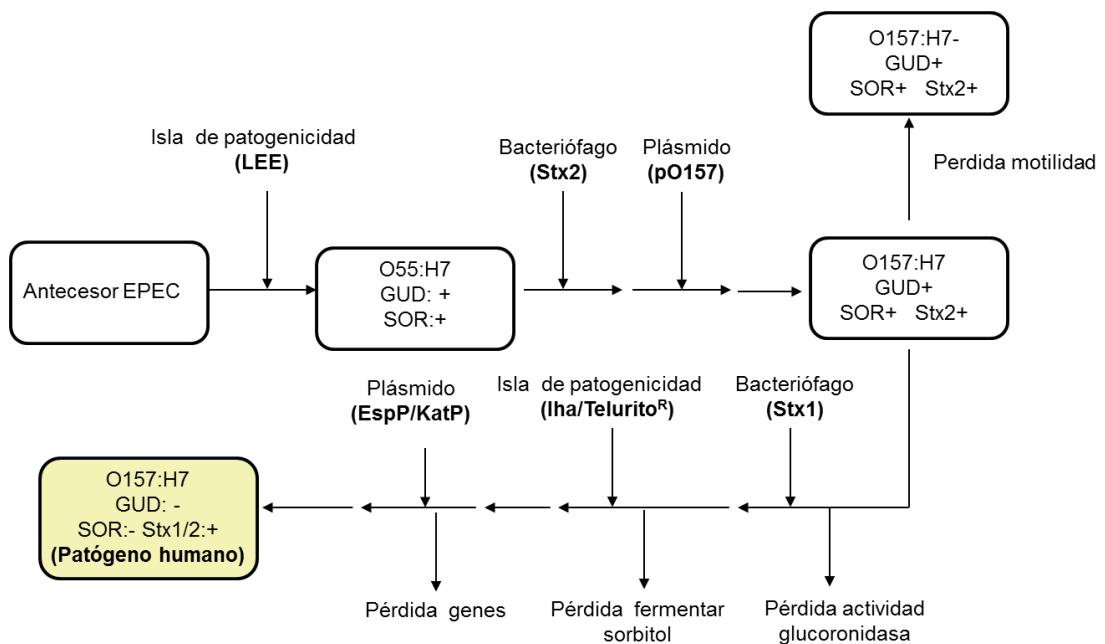


Figura 10. Teoría evolutiva del serotipo O157:H7 a partir de un antecesor EPEC. GUD: Glucuronidasa; SOR: Sorbitol ( Modificado: Law, 2000)

Destacan 4 tipos de elementos genéticos móviles en las cepas STEC: plásmidos, islas de patogenicidad, transposones y bacteriófagos (serán descritos por separado en el apartado siguiente).

- **Plásmidos:** Son moléculas de ADN extracromosómicas que normalmente pueden autorreplicarse, de menor tamaño que el ADN cromosómico y no suelen contener genes que codifiquen para funciones celulares esenciales. Principalmente, son moléculas circulares de ADN de doble cadena, no obstante, raramente se han descrito plásmidos lineales (Hinnebusch y Tilly, 1993). El número de copias dentro de la célula es muy variable, y se pueden encontrar bacterias con una sola copia del plásmido o cepas con incluso más de 40 copias. Generalmente se transfirieren por conjugación y en ocasiones por transformación entre bacterias.

Por lo general, para que una bacteria incorpore un plásmido, este tiene que aportarle una ventaja adaptativa, sino lo perderá. En STEC se pueden encontrar diferentes plásmidos siendo los más relevantes aquellos que codifican para genes de virulencia, por ejemplo *hlyA* localizada en el plásmido pO157. Además se encuentran plásmidos que contienen genes de resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados o que pueden codificar enzimas para la utilización de fuentes de carbono alternativas, dándole la posibilidad a la bacteria de poder sobrevivir en diferentes ambientes.

- **Islas de patogenicidad (PAI):** Los genes que codifican para los principales factores de virulencia están codificados en las islas de patogenicidad. En los extremos 3' y 5' de las PAI se encuentran las regiones cortas (entre 16 y 20 pb) de repeticiones directas (DR) cuyas secuencias son parecidas a las regiones de integración de los fagos *att*. En ocasiones llevan incorporado el gen *int* que codifica para una integrasa que facilita su integración cromosoma. Todas estas características sugieren su movilidad. Se han identificado y caracterizado diferentes PAI en STEC. La más característica es LEE, que participa en las lesiones de A/E.

El contenido nucleótido de G+C de las islas difiere del contenido de G+C del resto del genoma, siendo muy similar entre diversas PAI distribuidas en diferentes grupos clonales y serotipos. Además al poseer características propias de elementos móviles, indica que se movilizan o que en algún momento se han movilizado por transferencia

horizontal (Konczy *et al.*, 2008; Muniesa *et al.*, 2006; Schmidt, 2010). No todas las islas de patogenicidad son móviles, como ocurre con LEE que generalmente no se moviliza.

- **Transposones:** Son fragmentos de ADN que pueden moverse e integrarse en diferentes regiones del cromosoma o saltar de un genoma a otro. No requiere que existan regiones homologas entre el transposón y su sitio de integración. Los elementos transponibles pueden provocar cambios genéticos, ya sea por la incorporación de un gen, porque provocan mutaciones o reorganizan el ADN provocando deleciones del material genético. Por ejemplo pueden contener codones de parada o secuencias de terminación.

Los transpones simples o elementos de inserción (IS), están constituidos por una cadena corta de ADN, que contiene un gen necesario para la transposición que se denomina transposasa y flanqueado por secuencias repetidas invertidas. Los transposones compuestos son aquellos que contienen genes extras y están flanqueados en cada extremo por elementos IS. El fenómeno de la transposición se denominara simple cuando se lleva a cabo la escisión del transposón y unión a un nuevo lugar, o transposición replicativa cuando el transposón original permanece en el sitio parental y una réplica se inserta en un nuevo locus del ADN.

## 1.6 Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan a las bacterias y parasitan su maquinaria enzimática. Fueron observados en 1915 por Frederick W. Twort y descritos en 1917 por Félix d'Herelle, quién postuló el término de bacteriófago para nombrar al agente bactericida que observó, "bacteria" y "phageton" (ingerir en griego). Los fagos son elementos ubicuos, ya que se pueden encontrar en diferentes lugares en la naturaleza (elevadas y bajas temperaturas, ambientes áridos, desérticos, acuáticos, ácidos...) y se calcula que es la entidad biológica más abundante en el planeta Tierra, con una estimación de  $10^{31}$  fagos (Whitman *et al.*, 1998).

El genoma de los fagos puede ser de RNAss (MS2, Q $\beta$ ), RNAds ( $\phi$ 6), ADNss ( $\phi$ X174, M13) o ADNds (T7, T4,  $\lambda$ ). El material genético se encuentra en el interior de una cápside proteica. Algunos presentan una cápside icosaédrica sin cola y otros pueden tener cola, contráctil o no, o corta, que utilizan para la inyección del ácido nucleico dentro de la célula. En algunos casos existen fagos con formas diversas (de botella, limón o huso, caña, etc), sobretodo en bacterias ambientales y arqueobacterias.

### 1.6.1 Ciclos replicativos de los fagos

Dependiendo del resultado de la infección de la célula huésped, los fagos pueden presentar dos ciclos diferentes: ciclo lítico o ciclo lisogénico. Los bacteriófagos se clasifican en **fagos virulentos**, aquellos que sólo tienen la opción de iniciar la replicación y finalmente provocan la lisis celular, por lo tanto hablamos de fagos que siguen sólo el ciclo lítico; y los **fagos atemperados** que una vez infectan a la célula pueden entrar en ciclo lítico o lisogénico (Campbell, 2003).

En el caso del fago lambda, al ser un fago atemperado se ha utilizado como modelo de estudio de ambos ciclos. Este modelo también es aplicable a otros muchos fagos atemperados. En el ciclo lítico el bacteriófago se encuentra multiplicando su material genético y empaquetándolo para poder propagarse en el medio. Sin embargo, en el ciclo lisogénico el ADN vírico se replica al igual que el ADN bacteriano, teniendo bloqueado los genes que inducen la excisión del ADN del fago del cromosoma la formación de la cápside fágica y el empaquetamiento del ADN del fago en la cápside. Una bacteriófago que se encuentra en ciclo lisogénico puede pasar a ciclo lítico.

Si el bacteriófago entra en el **ciclo lítico** (Figura 10), se diferencian 5 etapas desde el momento que el fago infecta una célula, hasta que la lisa para liberarse en el medio (en *E. coli* el ciclo ocurre en 22 minutos). Presentamos el modelo descrito para el fago lambda:



- **Adsorción:** Los bacteriófagos se unen a los receptores en la membrana de las bacterias a través de las fibras de la cola o de alguna estructura análoga. Cada tipo de bacteriófago se une a unos receptores específicos. Estos receptores pueden ser lipopolisacáridos y proteínas de la pared celular, ácidos teicoicos, flagelos o el pili, entre otros. Existe una especificidad entre fago y bacteria huésped mediada por la especificidad al receptor.
- **Penetración:** Tras la adsorción, el fago utiliza una lisozima que se encuentra en la cola, para perforar la pared bacteriana y liberar su ADN en el interior de la bacteria. Aquellos fagos que tengan cola contráctil la utilizarán para facilitar el paso del ADN de la cápside al interior citoplasmático, como si fuera una jeringuilla. Tras el paso al citoplasma, el ADN se circulariza a través de los extremos cohesivos, utilizando las ligasas del huésped, para ser menos accesible a las exonucleasas bacterianas. Además posee bases modificadas para evitar la degradación por las endonucleasas bacterianas.
- **Síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas víricas:** El fago, utilizando la maquinaria celular del huésped, sintetiza por un lado ARNm, para poder traducirlo y dar lugar a las proteínas víricas, y por otro lado, tiene lugar la replicación del ADN para producir más genomas víricos. Durante la síntesis, el ADN puede ser modificado para evitar ser degradado por las endonucleasas bacterianas en el proceso de replicación, como sucede en el caso de los fagos T4 que sintetizan un análogo a la cisteína que está glicosilado.
- **Ensamblaje de las partículas fágicas:** Una vez se han producido las proteínas de la cápside, se produce el ensamblado de éstas, con la ayuda de unas proteínas que conforman el empaquetosoma ("*packasome*"), el ADN es trasladado al interior de la cápside, formándose lo que se denomina como cabeza madura. A continuación se unirán las colas, que se habían, ensamblado por separado.
- **Liberación de las partículas fágicas:** Los fagos lisan sus células huésped al final de la fase intracelular, utilizando diversos enzimas, como por ejemplo lisozimas o lisinas, que provocan la ruptura de la membrana y la pared celular.

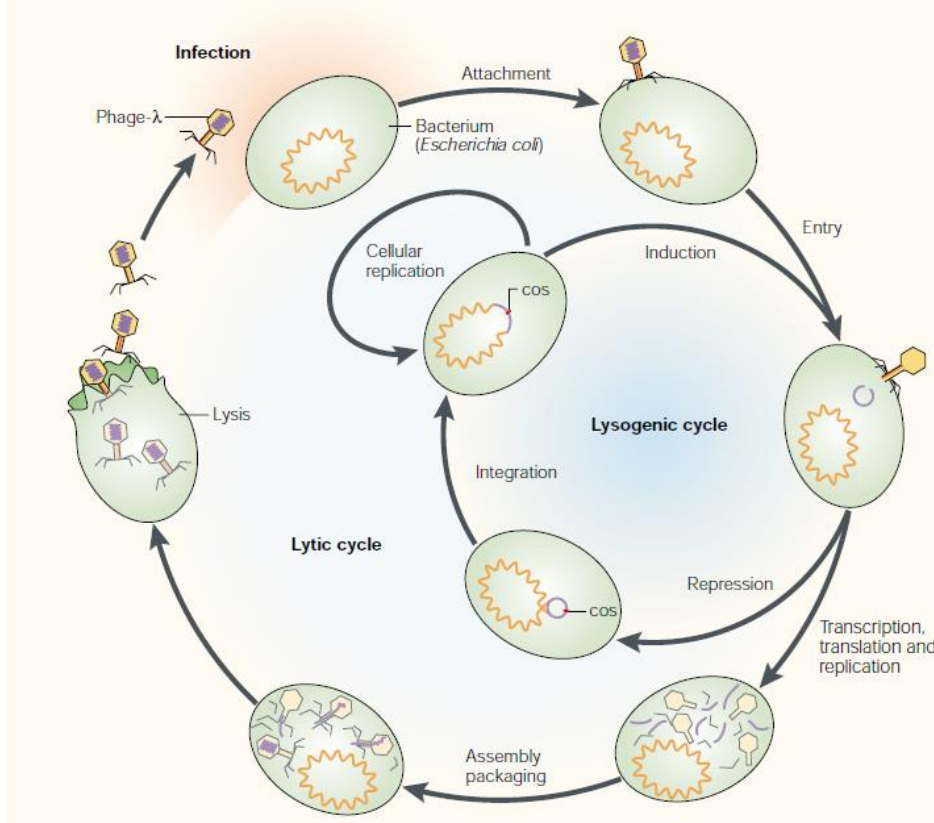


Figura 10. Ciclo de los bacteriófagos (Campbell, 2003)

En el **ciclo lisogénico** (Figura 10) el ADN tras ser inyectado se integra en el cromosoma de la bacteria por recombinación específica de sitio y se replica a la vez que el cromosoma de la célula. En el genoma de los bacteriófagos se encuentra el gen *int*, que codifica para una integrasa, necesaria para la integración en una región del ADN bacteriano, denominada sitio de integración o *att* (“*attachment*”). Los fagos localizan lugares de integración específicos en el cromosoma bacteriano (Recktenwald y Schmidt, 2002; Serra-Moreno *et al.*, 2007). Algunos fagos, como el P1, en lugar de integrarse en el cromosoma de la bacteria, se circularizan y actúan como si fuera un plásmido, se conoce como **pseudolisogenia** (Weinbauer, 2004). A la forma del virus que permanece en el interior de su huésped se le denomina profago, y a las bacterias infectadas lisógenos o bacterias lisogénicas.

Una consecuencia de la lisogenia, es el fenómeno conocido como conversión lisogénica. Esto ocurre cuando un fago atemperado induce un cambio en el fenotipo de su huésped, proporcionándole genes adicionales que le benefician, ya sean genes de virulencia, genes de resistencia a antibióticos, capacidad para metabolizar determinados compuestos o para colonizar nuevos nichos. Por ejemplo, en la bacteria *Salmonella*, cuando es infectada por un fago  $\epsilon$ , éste modifica las enzimas implicadas en la síntesis de los LPS, modificando su membrana.

Se puede encontrar en el medio ambiente, un tercer tipo de ciclo, que es el llamado **infección crónica**. Esto sucede cuando el bacteriófago infecta a la bacteria, utiliza su maquinaria para replicarse al igual que en el ciclo lítico, pero a diferencia de este, su salida al exterior celular no provoca la lisis de la bacteria, sino que sale por extrusión (Weinbauer, 2004).

### 1.6.2 Ciclo lítico y lisogénico en fagos atemperados

En los fagos atemperados, tras la infección tienen lugar la decisión de si entrar en lisogenia o en ciclo lítico. El fenómeno ha sido ampliamente descrito en el fago  $\lambda$ , y siguen el mismo modelo los fagos relacionados, llamados fagos lamboides, como los fagos Stx. Hay varias proteínas reguladoras implicadas, pero principalmente hay dos importantes: el represor *ci* (producto del gen *ci*) que promueve la lisogenia y la proteína Cro, (producto del gen *cro*,) que promueve el ciclo lítico. Si prevalece el represor, la producción de Cro se inhibe y se produce el ciclo lisogénico, ya que se inhibe la transcripción de los genes víricos. Si prevalece Cro, se inhibe *ci* y se inicia el ciclo lítico. Las dos proteínas se unen a los promotores  $O_R$  y  $O_L$ , y dependiendo del que se una, se bloquea o no la transcripción del otro y como consecuencia de ciertas proteínas víricas.

Los niveles de *CI*, dependerán de las proteínas CII y CIII. CII es una proteína activadora de la transcripción que reconoce el promotor  $P_{RE}$ , e inicia la transcripción del gen *ci*, que codifica para el represor. También se une al promotor  $P_i$ , hará que se transcriba la

integrasa, y al promotor  $P_{AQ}$ , que transcribirá un mRNA antisentido (antiQ) complementario a un mRNA (proteína Q) necesario para la expresión de los genes víricos estructurales y de lisis, y que quedará bloqueada. La actividad de la proteína CII está influenciada por las condiciones ambientales. Por ejemplo, cuando *E. coli* se encuentra en condiciones ricas de nutrientes, produce muchas proteasas y CII, que es susceptible a las proteasas, es degradada. CIII protege de la degradación a CII.

Por lo tanto, la acción de CII, CI y el RNA antisentido, reprimirán ciertas proteínas víricas, pero no se reprimirán ni la integrasa ni el represor CI. Sin embargo, sí CII no fuera abundante (por ejemplo, en un ambiente rico nutrientes) se acumulará Cro y se producirá el ciclo lítico.

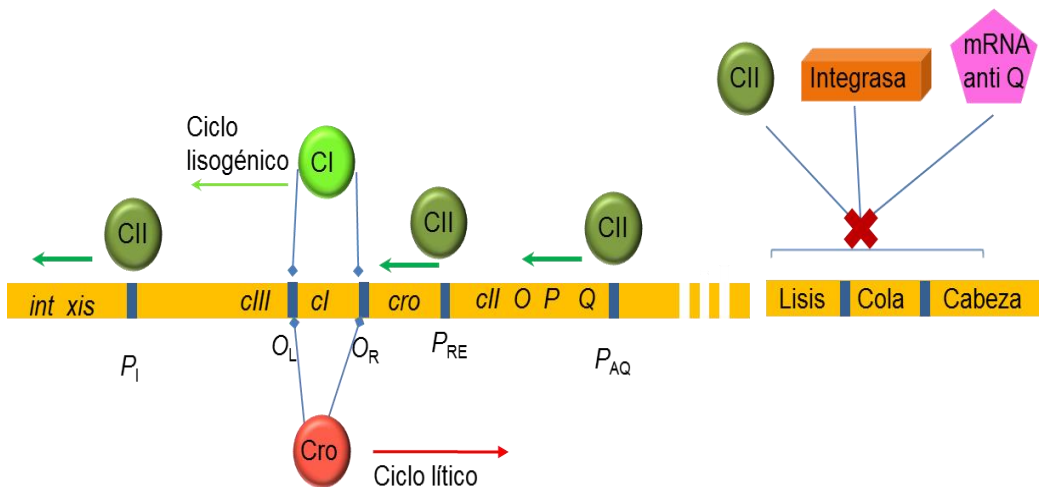


Figura 11. Esquema simplificado del mecanismo de regulación vía: lisogénica o lítica

### 1.6.3. Inducción del ciclo lítico

Dependiendo de las condiciones intracelulares y ambientales, el profago puede inducir el ciclo lítico. Una de las vías más frecuentes de inducción se debe a factores que estimulen la respuesta SOS en la bacteria. Esta respuesta es un mecanismo integral de defensa de *E. coli* que promueve la supervivencia celular en condiciones de daño del ADN. En

esta vía juega un papel fundamental la proteína RecA, encargada de la recombinación homóloga (Kowalczykowski *et al.*, 1994). Cuando RecA está activa, actúa como proteasa y cataliza la degradación del represor del ciclo lítico (CI) en una región conservada de la proteína cercana al centro de la proteína, cortando el vínculo alanina-glicina. Esto provoca que aumente la síntesis de Cro y se inhiba CI, y por lo tanto provoca el inicio del ciclo lítico (Little, 1984; Bell *et al.*, 2000).

Se han descrito varios factores que inducen el ciclo lítico activando la respuesta SOS.

- **Antibióticos:** Algunos de los antibióticos usados en terapia humana o animal promueven la respuesta SOS por la célula, como por ejemplo: los betalactámicos, las quinolonas, como la ciprofloxacina, o el trimethoprim (Kimmitt *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). La mitomicina C, que no es considerada un antibiótico, es un fármaco usado en quimioterapia anticancerosa. En concentraciones subinhibitorias es de uso común en los laboratorios para la inducción de fagos (Mühldorfer *et al.*, 1996; Muniesa *et al.*, 2004).
- **Inductores eucariotas:** Ciertas hormonas como la norepinefrina (Pacheco y Sperandio 2009), o componentes celulares como los neutrófilos o el contacto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que dañan el ADN, producen la activación del ciclo lítico.(Wagner *et al.*, 2001).
- **Luz ultravioleta (UV), radiación o altas presiones hidrostáticas** (Aertsen *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2003). Se ha observado en el procesamiento alimentario que al intentar reducir o inactivar la población bacteriana se produce un aumento del número de fagos (Erickson y Doyle 2007).

La inducción del ciclo lítico de los profagos por una vía independiente de RecA no está definida, ni tampoco la integridad de las partículas que se forman. No obstante, se han descrito algunos compuestos como el EDTA o el citrato sódico, ambos compuestos quelantes de iones, que producen un elevado aumento del número de genomas fágicos (Imamovic y Muniesa, 2012), aunque el mecanismo de esta inducción no está definido. La presencia en el medio de iones de Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup> y el pH alcalino estimula la catalización del vínculo alanina-glicina, igual que provoca RecA en CI.

#### 1.6.4 Transducción

Los bacteriófagos son un tipo de elemento genético móvil, como lo son los plásmidos o los transposones. Actúan como vectores de la transmisión horizontal de genes de unas cepas a otras, mediante el mecanismo conocido como transducción. A diferencia de otros mecanismos de transmisión genética horizontal, la transducción no requiere contacto entre la célula donadora y la receptora. Se conocen dos tipos:

- **Transducción generalizada:** Es un proceso en el que parte del ADN bacteriano es empaquetado dentro de la cápside de un fago en lugar del ADN del propio fago, y a continuación este ADN es transferido a otra bacteria por medio de la partícula fágica. Ocurre en el ciclo lítico, cuando los enzimas responsables de cortar el ADN viral (en la llamada secuencia *pac*) que luego se ha de empaquetar dentro del bacteriófago, cortan por error fragmentos de ADN bacteriano que son empaquetados. Este ADN bacteriano proveniente de diferentes partes del genoma, incluyendo genes plasmídicos, formando lo que se denominan partículas de transducción generalizada. Estas partículas pueden infectar a una nueva cepa huésped, dado que la cápside permite la inyección del ADN en otra célula si encuentra su receptor. Una vez en la cepa receptora, ésta podrá incorporar o no el nuevo ADN mediante recombinación. Pero esta partícula ya no podrá volver a propagar, porque ya no posee los genes fágicos necesarios para su replicación. Por ejemplo, en un lisado del fago P1 se detecta que alrededor del 30% de los fagos son partículas de transducción generalizada.
- **Transducción especializada:** Se produce cuando un profago atemperado entra en el ciclo lítico y empaqueta todos sus genes dentro de la cápside, a diferencia de la generalizada. Pero en el proceso de empaquetamiento se pueden encapsidar un fragmento discreto de ADN bacteriano adyacente a los genes del profago o inserto dentro del genoma del profago, que puede corresponder a un solo gen (Miller, 2004). Una vez el fago infecta un nuevo huésped, estos genes podrán ser incorporados en la cepa huésped en el lugar donde se inserte el profago. A diferencia de la generalizada, en

la cepa huésped el profago podrá volver a inducirse y formarse la partícula vírica, ya que posee todo los genes necesarios para su constitución y para la propagación del virus.

## 1.7 Bacteriófagos portadores de genes de virulencia

Freeman en 1951, observó que la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*, para producir la enfermedad conocida como difteria, necesitaba tener en su genoma un profago (fago  $\beta$ ) con los genes de la toxina diftérica (Freeman, 1951). Más recientemente, numerosas secuenciaciones de genomas bacterianos y en particular del genoma de *E. coli*, han demostrado que en gran parte está formado por profagos y que éstos juegan un papel importante en la evolución y adaptación a nuevos huéspedes mediante la transferencia horizontal de genes, por transducción (Boyd y Brüssow, 2002). Se han descrito que diferentes genes virulencia, en particular toxinas, se encuentran codificadas en el genoma de fagos. Este es el caso de la neurotoxina de *Clostridium botulinum* o la toxina colérica de *Vibrio cholerae*, entre otras (Brüssow *et al.*, 2004). Además tras la aparición de nuevas cepa patógenas (Laing *et al.*, 2012), y el hecho de que existen muchos genes flanqueados por regiones homólogas a fagos, ahonda cada vez más en la hipótesis de que muchos genes que codifican para factores de virulencia se encuentran en el genoma de bacteriófagos o han sido movilizados por ellos. En los últimos años se han descrito distintos fagos que codifican para factores de patogenicidad en *E. coli*. Como por ejemplo NleA (Creuzburg *et al.*, 2005), Cif (Nougayrède *et al.*, 2005), y Cdt (Cytolethal distending toxin) (Asakura *et al.*, 2007; Allué-Guardia *et al.*, 2011).

### 1.7.1 Bacteriófagos Stx

En 1984 se describió que las dos subunidades de la Stx estaban codificadas en el genoma de un bacteriófago (O'Brien *et al.*, 1984). Los fagos Stx son atemperados y tienen una organización genética de tipo lamboide, es decir, regulación del ciclo lítico y lisogénico

similar a lambda. Su organización incluye los genes tempranos, los genes tardíos y los muy tardíos. Los genes *stx* se encuentran ubicados en la región de genes tardíos, entre los promotores de lisis y los genes de lisis (Figura 12) (Plunkett *et al.*, 1999; Tyler *et al.*, 2004). Su posición está conservada entre los distintos fagos Stx (Karch *et al.*, 1999; Muniesa *et al.*, 2004; Allison, 2007). Cuando el profago Stx induce su ciclo lítico, empieza a transcribir las proteínas de lisis, y como la toxina se encuentra aguas arriba de éstos, en el proceso se expresan los genes *stx* y se produce un aumento de los niveles de toxina en el medio intracelular (Court *et al.*, 2007; Wagner y Waldor, 2002). La lisis de la célula causada por los fagos libera la toxina al medio extracelular.

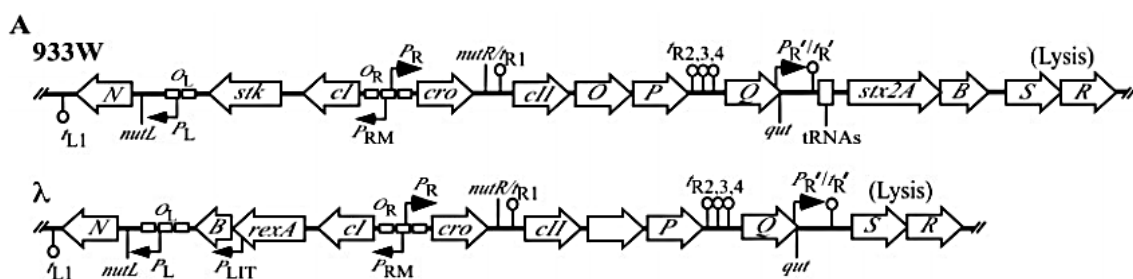


Figura 12. Regulación de la región Stx2 del fago 993 y  $\lambda$  (Tyler *et al.*, 2004)

Se ha descrito que el uso de antibióticos puede incrementar el riesgo de SUH en adultos que sufren una infección por STEC, ya que se pueden empeorar los síntomas. Esto parece ser debido a que ciertos antibióticos favorecen la inducción de los fagos Stx, y por lo tanto, el tratamiento da lugar a un aumento de la producción de la toxina y además contribuye a su liberación (Grif *et al.*, 1998; Kimmitt *et al.*, 2000; Dundas *et al.*, 2001). Dado que la Stx está directamente relacionada en el desarrollo del SUH, esta mayor expresión puede causar complicaciones severas en la infección.

Los fagos Stx presentan mosaicismos genéticos, derivado de fenómenos de recombinación con otros miembros de la familia (Johansen *et al.*, 2001) y con otros fagos que pueden coexistir en el cromosoma bacteriano. Los fagos Stx forman un grupo muy heterogéneo, ya que actualmente se considera un fago Stx a todo aquel fago que posea el



operón *stx* (Allison, 2007). Se agrupan en fagos Stx1 y fagos Stx2, dependiendo qué toxina codifiquen.

El tamaño de los fagos Stx varía entre 42.6 kb y 66.4 kb (Brüssow *et al.*, 2004; Muniesa *et al.*, 2004b). Se observan, principalmente, tres tipos de morfologías: *Podoviridae* (Fig.13a), *Siphoviridae* (Fig.13b), y en menor medida *Myoviridae* (Fig.13c) (Muniesa *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2011).

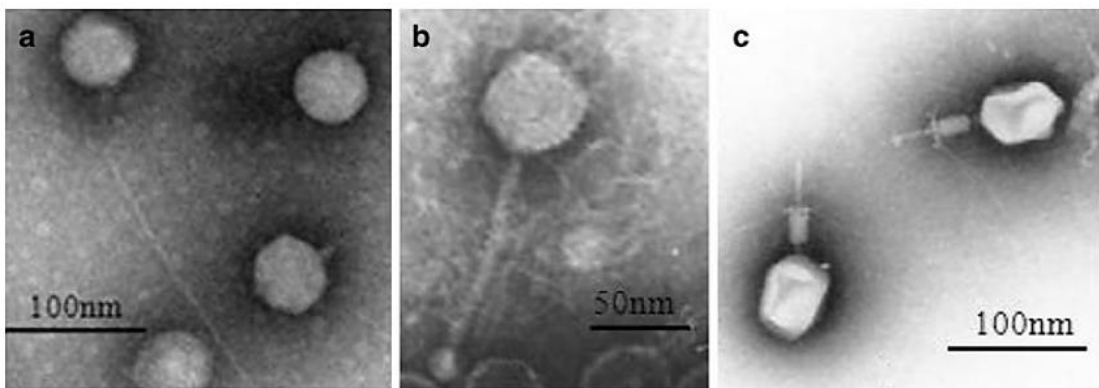


Figura 13. Diferentes morfologías de los fagos Stx (Yan *et al.*, 2011)

Se han descrito diferentes receptores de membrana bacteriana a los que se unen los fagos Stx para producir la infección. BamA (también llamado YaeT, en *E. coli*) es un receptor de membrana altamente conservado en las bacterias Gram negativas y es usado por los fagos Stx de cola corta (*Podoviridae*) para unirse a la bacteria (Smith *et al.*, 2007). BamA es un complejo formado por diferentes lipoproteínas y es necesario para la biogénesis de las proteínas integrales de la membrana externa (Ruiz *et al.*, 2006; Bos *et al.*, 2007). Además, fagos Stx de otros tipos pueden unirse a otros receptores de la membrana como FadL y LamB (Watarai *et al.*, 1998). Los fagos Stx2 son muy diversos y son capaces de infectar a diferentes huéspedes.

Existe diversidad en el lugar de integración (*attB*) de los fagos Stx en el cromosoma bacteriano y se han descrito diversos *loci*: *wrbA*, *yehV*, *sbcB*, *yecE*, Z2577, la región

intergénica *torS-torT*, *argW*, *ssrA* y *prfC* (Shaikh y Tarr, 2003; Creuzburg *et al.*, 2005; Besser *et al.*, 2007; Ogura *et al.*, 2007) Los fagos Stx2 como 933W y VT2-Sa suelen integrarse en la región *wrbA*. Otros fagos como  $\phi$ P27 se unen a *yecE*. Hay fagos del tipo Stx1 que se integran en la región *yehV* como CP-933V y VT1-Sakai (Shaikh y Tarr, 2003; Serra-Moreno *et al.*, 2007; Ogura *et al.*, 2009). El lugar de integración depende de la cepa huésped y de la disponibilidad de los loci preferenciales. Si el *locus* de inserción no está libre o no existe, los fagos Stx pueden insertarse en sitios secundarios en el cromosoma del huésped (Serra-Moreno *et al.*, 2007).

Los fagos de tipo lamboide suelen codificar para genes que transcriben proteínas sin funciones aparentes para el fago, ni para desarrollo lítico ni para el mantenimiento del ciclo lisogénico, bajo condiciones de laboratorio. A los genes que codifican estas proteínas se les denomina genes accesorios (o genes *moron*). Se especula que estas proteínas son útiles en el estado de profago y además aportan al *fitness* del lisógeno (Court y Oppenheim, 1983; Campbell, 1994). Los genes *stx*, son un excelente ejemplo de genes accesorios, ya que no contribuyen a las funciones líticas o lisogénicas, pero contribuyen a la virulencia de la bacteria. En los fagos Stx se pueden encontrar otros genes accesorios como son *Bor* y *Lom*, que confieren resistencia al suero y aumentan la supervivencia del huésped a los macrófagos (Plunkett *et al.*, 1999; Hendrix *et al.*, 2000; Brüßow *et al.*, 2004) o genes como la esterasa codificados en fagos 993W (Nübling *et al.*, 2014)

### 1.7.2 Bacteriófagos Stx en el medio ambiente

Cuando se induce el ciclo lítico en fagos Stx se contribuye a la liberación de las partículas víricas al medio ambiente. La presencia de fagos Stx en el ambiente, puede favorecer la aparición de nuevas cepas STEC.

Se han detectado fagos Stx libres en agua residual, llegando a detectarse hasta  $10^4$  CG/ml), siendo infectivos algunos de ellos (Muniesa y Jofre, 1998, 2000; Muniesa *et al.*, 2004; Imamovic *et al.*, 2010). Se observan principalmente fagos Stx2, ya que no hay muchos

estudios de fagos Stx1 (Dumke *et al.*, 2006). Las aguas residuales poseen una alta carga fecal, pero no se puede relacionar directamente la presencia de los fagos con la carga fecal, probablemente por el hecho de que existan STEC extraintestinales (Wester *et al.*, 2013) y de que es un patógeno que no siempre tiene que estar presente. En aguas con baja carga fecal, como los ríos, también se han detectado fagos Stx (Muniesa *et al.*, 1999; Dumke *et al.*, 2006).

En productos cárnicos preparados para el consumo y en ensaladas comerciales también se ha detectado la presencia de fagos Stx libres (Imamovic y Muniesa, 2011) y en algunos casos infectivos. Los diferentes tratamientos que se realizan a las aguas y a los productos alimentarios, como tratamientos térmicos, altas presiones hidrostáticas o UV, la aplicación de productos quelantes, e incluso agentes microbianos, favorecen la inducción de los fagos Stx de sus huéspedes.

Los fagos Stx son más persistentes que sus huéspedes bacterianos tanto a la temperatura o al pH, como a los tratamientos comunes usados para la eliminación de los microorganismos. En procesos como la cloración, la radiación UV, la pasteurización o ante procesos de inactivación natural, se ha observado que comparando la reducción de densidad poblacional, en unidades logarítmicas, entre fagos Stx y cepas STEC, esta reducción es mucho mayor en las STEC (Muniesa *et al.*, 1999; Allué-Guardia *et al.*, 2014). En algunos tratamientos (UV), se ha llegado a no detectar la presencia de STEC mientras que los fagos Stx se habían reducido sólo 0.5 unidades logarítmicas (Allué-Guardia *et al.*, 2014).

## **1.8 Respuesta bacteriana al estrés ambiental**

Un apartado de la presente memoria de tesis doctoral intentará relacionar la infección por fagos Stx con respuestas a la infección a nivel de la célula huésped. El mantenimiento, adaptación y protección ante estrés ambiental son claves para la viabilidad celular. En la célula bacteriana la membrana celular al estar en contacto con el medio ambiente, es la primera barrera que tiene la bacteria frente agentes físicos, como por ejemplo cambios en la osmolaridad, agentes químicos, como puede ser el etanol, o frente

agentes biológicos, como sería una infección llevada a cabo por un fago. En *E. coli*, para, la célula dispone de varios sistemas a nivel de membrana que activan cascadas enzimáticas para poder responder a posibles factores que pueden dañar a la célula y que causan estrés. De éstos, cabe destacar las siguientes respuestas al estrés de membrana:

- **CpxAR:** El doble sistema CpxAR, responde frente a varias vías de estrés como por ejemplo el pH alcalino, sobreexpresión de lipoproteínas o proteínas del pilus, que dan como resultado un mal plegamiento de proteínas. Consta de dos componentes CpxA y CpxR. CpxA es el sensor histidina quinasa, que en momentos de estrés, fosforila CpxR activando entre otros genes chaperonas/proteasa (*spy*), el sistema disulfido oxidasa DsbA y petidil-propil-isomerasa PpdIA y ppiD (Raivio, 2005). Se ha descrito que juega un papel en la adhesión bacteriana a la célula eucariota (Humphreys *et al.*, 2004; Ruiz y Silhavy, 2005).
- **RcsBC:** El sistema de dos componentes RcsBC, se encarga de controlar los genes de respuesta a cambios de temperatura, osmolaridad y sobreproducción de proteínas de membrana. También protege a la célula frente algunos antibióticos betalactámicos y exposición a lisozimas. El sistema está formado por un sensor quinasa, RcsC, el cual frente a una respuesta de estrés, acaba fosforilando a RcsB. RcsB activa una amplia gama de genes, incluyendo proteínas de la membrana y regula negativamente la síntesis del flagelo (Majdalani y Gottesman, 2005).
- **BaeSR:** El sistema está compuesto por BaeS que es el sensor quinasa y BaeR que activa la regulación del ADN para responder al estrés de membrana (Raffa y Raivio, 2002). El sistema se activa además en presencia de indol y por algunas toxinas que alteran la integridad de la membrana. BaeSR está involucrado en la respuesta a drogas, metales pesados y zinc (Nishino *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2008, Wang y Fierke, 2013). Está también implicado en el control de la biosíntesis de los componentes de la membrana. Además BaeSR activa un sistema de resistencia de la célula eucariota frente a la invasión de virus, denominado CRISPR-Cas (figura 14). Este sistema está formado por una serie de repeticiones palindrómicas, que son homólogas, cada una de ellas, a regiones de

fagos (previamente infectados por algún antecesor de la cepa) y por genes denominados *cas* que provocan la degradación del ADN (Perez-Rodriguez *et al.*, 2011).

- $\sigma^E$ : Se activa el sistema sigma en respuesta a mutaciones o eventos que provocan alteraciones en la síntesis de proteínas de la membrana externa. El sistema está implicado en la supervivencia de la bacteria tras la invasión y para protegerse de las defensas del huésped (Raivio, 2005; Rowley *et al.*, 2006).
- **Psp**: El sistema Psp se activa principalmente cuando hay perturbaciones en la integridad y la carga de la membrana interna, sea por infección por fagos filamentosos, choque térmico, choque osmótico, tratamiento con etanol o la incubación prolongada en fase estacionaria (Rowley *et al.*, 2006).

## **2. OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

### 2.1 Capítulo 1: Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals.

- Determinar la presencia de fagos Stx2 libres en las muestras de heces de individuos sanos.
- Evaluar la capacidad infectiva de los fagos Stx2 presentes en las heces.
- Estudiar la capacidad de los fagos Stx2 presentes en las heces de transducir el gen *stx* a otras cepas y formar lisógenos.

### 2.2 Capítulo 2: Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater.

- Caracterizar las diferentes variantes de *stx*<sub>2</sub> en cepas STEC aisladas en el medio ambiente.
- Evaluar la capacidad de producción de la toxina Stx en la cepas ambientales
- Estudiar los diferentes serotipos de la cepas ambientales
- Evaluar los distintos genes de virulencia en la cepas ambientales
- Correlacionar los distintos genes de virulencia dependiendo de su presencia en las cepas STEC. Evaluar si se encuentran de forma simultánea o independiente
- Evaluar la posibilidad de que algún gen de virulencia pudiera movilizarse mediante transferencia horizontal.

### 2.3 Capítulo 3: Mobilization of *saa*, encoding an STEC autoagglutinating adhesin, in Shiga toxin producing *Escherichia coli*.

- Caracterizar las cepas *saa* positivas aisladas en agua residual.
- Diseño de una qPCR específica para la detección de *saa*
- Estudiar la inducción del ciclo lítico de posibles fagos Saa con un inductor clásico: mitomicina C.



- Evaluar la capacidad de transducción del gen *saa*
- Purificación de posibles fagos *saa*. Estudiar la infectividad y caracterizar morfológicamente estas partículas
- Estudio proteómico de las proteínas de los posibles fagos *saa*
- Determinar la presencia de *saa* en la fracción vírica de muestras ambientales

**2.4: Capítulo 4: BaeSR, involved in envelope stress response, protects against lysogenic conversion by Shiga toxin 2-encoding phages.**

- Estudio de la implicación de las diferentes vías de estrés de membrana en la formación de lisógenos con fagos Stx.
- Comparación de la formación de lisógenos con diferentes tipos de fagos Stx en el mutante de la vía BaeSR.
- Evaluación de la inducción de ciclo lítico por mitomicina C en lisógenos de fagos Stx obtenidos con cepa mutada para la vía BaeSR
- Estudio de la expresión del mRNA del receptor de los fagos Stx en mutantes de diferentes vías de estrés de membrana.

## **3. PUBLICACIONES**



## PUBLICACIONES

### 3.1 Listado de publicaciones

La presente tesis doctoral está basada en los siguientes artículos (orden cronológico):

1. **Martínez-Castillo A, Allué-Guardia A, Dahbi G, Blanco J, Creuzburg K, Schmidt H, Muniesa M.** 2012. Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater. *Environ Microbiol Rep* ; 4(1):147-55.
2. **Martínez-Castillo A, Quirós P, Navarro F, Miró E, Muniesa M.** 2013. Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl Environ Microbiol*; 79(16):4862-8.
3. **Imamovic L, Martínez-Castillo A, Benavides C, Muniesa M.** 2015. BaeSR, involved in envelope stress response, protects against lysogenic conversion by Shiga toxin 2-encoding phages. *Infect Immun*; 83(4):1451-7
4. **Martínez-Castillo A, Muniesa M.** Mobilization of *saa*, encoding an STEC autoagglutinating adhesin, in Shiga toxin producing *Escherichia coli*. Manuscrito en preparación.



### **3.2 Informe sobre la participación del doctorando en los artículos presentados.**

**Martínez-Castillo A, Allué-Guardia A, Dahbi G, Blanco J, Creuzburg K, Schmidt H, Muniesa M.** 2012. Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater. *Environ Microbiol Rep* ; 4(1):147-55.

El doctorando ha llevado a cabo la mayor parte del trabajo experimental, realizando el estudio de los diferentes genes de virulencia en las cepas salvajes. También ha participado en el posterior análisis y procesamiento de los datos obtenidos, así como en la redacción del artículo y diseño de las figuras.

**Martínez-Castillo A, Quirós P, Navarro F, Miró E, Muniesa M.** 2013. Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl Environ Microbiol*; 79(16):4862-8.

El doctorando ha realizado la mayoría de los procedimientos experimentales (extracciones de ADN fágico, qPCR, ensayos de infectividad, qPCR, etc...) y ha participado en la redacción del artículo y el diseño de las figuras.

**Imamovic L, Martínez-Castillo A, Benavides C, Muniesa M.** 2015. BaeSR, involved in envelope stress response, protects against lysogenic conversion by Shiga toxin 2-encoding phages. *Infect Immun*; 83(4):1451-7

El doctorando ha realizado la mayor parte de los trabajos experimentales. Llevando a cabo los experimentos de crecimiento bacteriano, estudios de lisogenia, obtención y complementación de ciertos mutantes, estudios de inducción, PCR, RT-PCR y análisis estadístico. Además ha participado en la redacción del artículo y diseño de las figuras.

**Martinez-Castillo A, Muniesa M.** Mobilization of *saa*, encoding an STEC autoagglutinating adhesin, in Shiga toxin producing *Escherichia coli*. Manuscrito en preparación.

El doctorando realizó todos los procedimientos experimentales (extracciones de ADN fágico, ensayos de inducción, ensayos de propagación, estudios de adhesión en cultivo celular, detección de *saa* en muestras ambientales, diseño de sonda y cebadares para *saa*, ensayos de qPCR, estudios morfológicos, etc...). Ha participado en el análisis de los resultados y procesamiento de los datos obtenidos. Ha realizado la redacción del borrador del artículo y ha diseñado las figuras.

Ninguno de los coautores de los artículos ha utilizado los datos descritos en estas publicaciones para la elaboración de su tesis doctoral.

Dra. M. Muniesa

Barcelona, Mayo de 2015

### 3.3 Informe sobre el factor de impacto

Las publicaciones que forman parte de la tesis doctoral presentada por Alexandre Martínez Castillo, han sido publicadas en revistas científicas relevantes en la línea de investigación en las que ha participado.

El artículo “**Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater**” fue publicado en la revista **Environmental Microbiology Reports**, siendo del primer cuartil de la categoría de Microbiología y Ciencias Ambientales en el año 2012 y presentado ese año un factor de impacto de **2.708**.

El artículo “**Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals**” se publicó en la revista **Applied And Environmental Microbiology**, siendo del primer cuartil de la categoría Biotecnología y Microbiología Aplicada en el año 2013 y teniendo un factor de impacto de **3.952**.

El artículo “**BaeSR, involved in envelope stress response, protects against lysogenic conversion by Shiga toxin 2-encoding phages**” fue publicado en la revista **Infection and Immunity**, en el año 2015. Es una revista del primer cuartil para las categorías de Inmunología y Enfermedades Infecciosas. En el año 2013 el factor de impacto fue de **4.156**.

Finalmente el artículo “**Mobilization of *saa*, encoding an STEC autoagglutinating adhesin, in Shiga toxin producing *Escherichia coli***” está actualmente en preparación.

Dra. M. Muniesa

Barcelona, Mayo 2015





## **4. RESULTADOS**



## **4.1 CAPITULO 1:**

**Bacteriófagos portadores de la toxina Shiga en muestras fecales humanas de individuos sanos**



## Bacteriófagos portadores de la toxina Shiga en muestras fecales humanas de individuos sanos

Alexandre Martínez-Castillo, Pablo Quirós, Ferran Navarro, Elisenda Miró y Maite Muniesa.

Applied and Environmental Microbiology 2013;79: 4862-4868

### Introducción

*Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC) es un patógeno que causa problemas intestinales y sistémicos y ha sido involucrado en varios brotes diseminados vía alimentos contaminados (Erickson y Doyle, 2007). El factor de virulencia principal de las STEC es la toxina Shiga (*stx*) que se encuentra codificada en el genoma de bacteriófagos. Los fagos Stx son un grupo heterogéneo genéticamente y morfológicamente, pudiéndose encontrar más de un fago Stx en el genoma de la STEC.

Los fagos Stx son fagos atemperados que residen como profagos dentro del cromosoma bacteriano. En algunas condiciones, como la presencia de antibióticos, se activa el ciclo lítico y se generan fagos Stx, lo que provoca la diseminación de *stx* en el medio ambiente. Los fagos Stx libres son potencialmente capaces de infectar otras bacterias, generando nuevos patógenos y la aparición de nuevos brotes (Bielaszewska *et al.*, 2011; L'Abée-Lund *et al.*, 2012).

Los fagos Stx se han detectado en diferentes ambientes contaminados con material fecal (Muniesa y Jofre, 1998; Tanji *et al.*, 2002; Dumke *et al.*, 2006; Imamovic *et al.*, 2010; Rooks *et al.*, 2010), siendo en muchos casos fagos infectivos y pudiendo transmitir el gen *stx* a otras cepas no patogénicas (Muniesa y Jofre, 1998). Esto puede ser debido a la inducción de cepas STEC o a la presencia de fagos Stx libres en las heces.

## Objetivos y metodología

El objetivo es detectar y cuantificar fagos Stx en las heces humanas de individuos sanos y evaluar la capacidad infectiva de estos fagos Stx para propagar en diferentes huéspedes.

Para llevar a cabo el estudio, se partió de 100 muestras de heces de individuos con una edad comprendida entre los 6 meses y los 102 años. Se trata de individuos a los cuales no se les aisló ninguna enterobacteria ni se detectó protozoos, rotavirus o adenovirus. Para los ensayos de propagación de los fagos Stx2 se usaron *E. coli* C600, *E. coli* O157: H7 y *Shigella sonnei* 866, todas ellas *stx* negativas. Se cuantificaron copias genómicas de *stx*<sub>2</sub> por qPCR en el ADN fágico aislado de las muestras de heces y se evaluó la infectividad de los fagos Stx2 por su capacidad de propagación en diferentes huéspedes. Se utilizaron los colifagos somáticos para determinar la presencia de fagos virulentos infecciosos para *E. coli* en las muestras.

## Resultados

Las muestras presentaron cierta diversidad en la concentración de colifagos somáticos, que variaba entre 5 y 10<sup>7</sup> UFP/g, tal y como se observaba en estudios anteriores (Grabow, 1995). Se realizaron controles de amplificación antes de desencapsidar el ADN de los fagos para asegurar que después del tratamiento con ADNasas no quedó ADN no encapsidado que pudiera dar lugar a falsos positivos. Todos los controles fueron negativos.

Se analizó la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> en la fracción de ADN fágico de las muestras de heces. Se detectó la presencia de *stx*<sub>2</sub> en el 62% de las muestras por qPCR, mostrando una densidad media de 2.6 x 10<sup>4</sup> fagos Stx por gramo de hez. Se observó estadísticamente que existía una mayor frecuencia de fagos Stx en las muestras de individuos adultos (mayores de 19 años).

Para confirmar la presencia de fagos Stx2 se realizaron PCR convencionales de la subunidad A de *stx*<sub>2</sub> que permitían amplificar fragmentos más largos del gen que fueron seleccionados (11 amplicones) para su secuenciación. Se observó una homología entre el 95% y el 99% con diferentes variantes de *stx*<sub>2</sub>.

Referente a los estudios de infectividad de los fagos Stx presentes en las muestras de heces, se comparó el número de copias genómicas de *stx*<sub>2</sub> en el ADN fágico en el mismo volumen de la muestra original y después de propagar los fagos en tres cultivos bacterianos de tres cepas de *E. coli* diferentes. Se consideró propagación un aumento en el número de copias. Sólo en una de las 20 muestras evaluadas no se detectó que hubiera propagación de los fagos Stx, siendo dicha muestra la que presentaba mayor cantidad de colifagos somáticos. De las tres cepas utilizadas para la propagación, se observó menor propagación con *E. coli* C600 como cepa huésped, con un 35% de muestras que aumentaban la densidad de fagos Stx. Por otro lado, *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei* 866 presentaban una propagación del 80% y el 75% de las muestras respectivamente. En algunas muestras se observaron fagos Stx capaces de propagar sobre las tres cepas, mientras que en algunas muestras sólo eran capaces de propagar sobre una única cepa.

Además, se evaluó la capacidad de generar lisogenos de los fagos Stx presentes en las muestras y se detectó la infectividad de los fagos Stx sobre las tres cepas huéspedes mediante la hibridación las calvas de lisis generadas en membranas de nylon y su posterior detección con sondas específicas para la detección de *stx*<sub>2</sub>. Se obtuvo un resultado positivo al revelar las membranas de nylon que después fue cuantificado para determinar el número de unidades formadoras de calva (UFP)/ml. El número fue menor de lo observado por qPCR probablemente debido al tiempo transcurrido hasta realizar el experimento. No se obtuvieron lisogenos de fagos *stx*<sub>2</sub> con las cepas huésped utilizadas.



## Discusión

La incidencia de infecciones producidas por STEC en el área de Barcelona, donde el estudio fue llevado a cabo, es relativamente bajo y cada año son reportados muy pocos casos. Sin embargo la presencia de fagos Stx2 libres en el agua residual en España es alta (Imamovic *et al.*, 2010; Muniesa y Jofre, 1998), al igual que en otros países (Muniesa y Jofre, 2000; Tanji *et al.*, 2002; Dumke *et al.*, 2006; Rooks *et al.*, 2010). Además algunos de los fagos Stx libres detectados en agua residual como en alimentos son capaces de propagar sobre bacterias de laboratorio.

En estudios previos se había sugerido que, debido a la presencia de fagos Stx libres en los alimentos, estos serían ingeridos por personas sanas y excretados en las heces y de ahí la elevada densidad de fagos Stx en muestras de agua residual. También se había especulado si la presencia de los fagos Stx en el agua residual se debía a la presencia de un reservorio de STEC lisogénicas en el agua. El presente estudio es la primera evidencia que demuestra la presencia de fagos Stx excretados por individuos sanos.

La presencia en individuos mayores de 19 años es superior que en individuos más jóvenes. Esto puede ser atribuido a una mayor complejidad en sus dietas y a la posibilidad de haber ingerido mayor cantidad de fagos Stx durante su vida. No obstante, una de las enfermedades con las que están asociadas las bacterias STEC es la capacidad de producir el síndrome urémico hemolítico (SUH), y éste tiene una incidencia mayor en niños que adultos (Karch *et al.*, 2005). Dado que las muestras utilizadas en el estudio provenían de individuos sanos que no habían desarrollado SUH, la incidencia de fagos Stx en individuos jóvenes no es esperable que fuera elevada.

Algunos de los fagos Stx presentes en las muestras analizadas son infecciosos y por lo tanto tiene la posibilidad de transducir el gen *stx*<sub>2</sub>. Únicamente hubo una muestra de las 20 analizadas en la que los fagos Stx presente no fueron capaces de infectar sobre ninguna de los tres huéspedes utilizados. Esto puede ser debido que dicha muestra era la que poseía un mayor número de colifagos somáticos, y por lo tanto mayor número de fagos virulentos que

podieron lisar las bacterias huéspedes antes que éstas pudieran ser infectadas por los fagos Stx presentes en la muestra, impidiendo su propagación.

No se obtuvieron lisogenos de fagos Stx de las muestras analizadas. Este resultado está en concordancia con otros estudios (Imamovic y Muniesa, 2011), que indican que los lisogenos de fagos Stx ocurren a una baja frecuencia. Además, no todos los fagos Stx son capaces de formar lisogenos a la misma frecuencia (García-Aljaro *et al.*, 2005) o lisogenizar la misma bacteria huésped (Serra-Moreno *et al.*, 2006). No obstante, el hecho de que los fagos Stx presentes en las muestras tengan capacidad infectiva representa que, si se dieran las condiciones adecuadas, podrían formarse lisogenos de fagos Stx.

Este estudio nos muestra que individuos sanos pueden ser portadores de fagos Stx libres. La mera presencia de fagos Stx no determina sufrir ninguna enfermedad derivada de la presencia del gen *stx*. Sin embargo, en clínica para dar como positivo una infección por STEC se utiliza en muchos casos la detección del gen *stx* en las muestras fecales por métodos moleculares. El problema radica en que la extracción del ADN de las muestras utiliza métodos que también pueden extraer el ADN de los fagos presentes y por lo tanto, al liberar su material genético, el ADN de fagos podría dar falsos positivos.



# Shiga Toxin 2-Encoding Bacteriophages in Human Fecal Samples from Healthy Individuals

Alexandre Martinez-Castillo,<sup>a</sup> Pablo Quirós,<sup>a</sup> Ferran Navarro,<sup>b</sup> Elisenda Miró,<sup>b</sup> Maite Muniesa<sup>a</sup>

Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain<sup>a</sup>; Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Barcelona, Spain<sup>b</sup>

Shiga toxin-converting bacteriophages (Stx phages) carry the *stx* gene and convert nonpathogenic bacterial strains into Shiga toxin-producing bacteria. Previous studies have shown that high densities of free and infectious Stx phages are found in environments polluted with feces and also in food samples. Taken together, these two findings suggest that Stx phages could be excreted through feces, but this has not been tested to date. In this study, we purified Stx phages from 100 fecal samples from 100 healthy individuals showing no enteric symptoms. The phages retrieved from each sample were then quantified by quantitative PCR (qPCR). In total, 62% of the samples carried Stx phages, with an average value of  $2.6 \times 10^4$  Stx phages/g. This result confirms the excretion of free Stx phages by healthy humans. Moreover, the Stx phages from feces were able to propagate in enrichment cultures of *stx*-negative *Escherichia coli* (strains C600 and O157:H7) and in *Shigella sonnei*, indicating that at least a fraction of the Stx phages present were infective. Plaque blot hybridization revealed lysis by Stx phages from feces. Our results confirm the presence of infectious free Stx phages in feces from healthy persons, possibly explaining the environmental prevalence observed in previous studies. It cannot be ruled out, therefore, that some positive *stx* results obtained during the molecular diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)-related diseases using stool samples are due to the presence of Stx phages.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are pathogens involved in food-borne outbreaks that may cause serious intestinal and systemic disease (1). The main virulence factor of STEC is the production of Shiga toxin. The genes coding for Shiga toxin (*stx*) and its variants are harbored in the genomes of temperate bacteriophages (Stx phages) (2, 3). Stx phages can be associated with the pathogenic subset of locus of enterocyte effacement (LEE)-positive STEC strains but also with LEE-negative STEC isolates from diverse serogroups (4).

Stx phages are highly mobile genetic elements. They are involved in the pathogenic profile of their bacterial hosts, in the development of the genome plasticity of host bacteria, in the regulation of pathogenicity factors, and in the survival and dissemination of *stx* in the environment (2, 5, 6). One or more Stx phages may be present in the genome of an STEC strain, and their incorporation can lead to the emergence of new pathogenic strains, as observed in recent outbreaks (7, 8). Stx phages are a heterogeneous group both genetically and morphologically, as almost any phage with an *stx* operon is referred to as an Stx phage. Despite their heterogeneity, most Stx phages conserve lambdaoid-like regulation of lysis-lysogeny cycles. Activation of the lytic cycle culminates in bacterial cell lysis and release of Shiga toxin. However, free infectious Stx phages are also released after cell lysis, contributing to the spread of *stx*. Released Stx phages may infect new bacterial cells and convert them into pathogens, thereby playing an important role in the evolution of STEC strains (9).

Free Stx phages have been found in several environments with fecal pollution (10–14). A fraction of the Stx phages found free in the environment are infectious and potentially able to transfer the *stx* gene to nonpathogenic strains (12), thus converting them into Stx producers. This could occur in environments that are polluted with feces carrying Stx phages either as a consequence of induction of the lytic cycle of the Stx phages from an STEC reservoir or as a consequence of direct excretion of these phages in feces.

This is the first paper to isolate and quantify free Stx phages

from feces of healthy humans in order to establish whether free Stx phages are directly present in feces and contribute to the environmental pool of *stx* genes. We evaluated the capacity of infectious Stx phages detected in feces to propagate in bacterial hosts.

## MATERIALS AND METHODS

**Fecal samples.** This study was performed on fecal samples from 100 individuals aged 6 months to 102 years who attended the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) over a 10-month period. Stool samples were processed according to conventional protocols to isolate enteropathogenic bacteria (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Vibrio*, toxigenic *Clostridium difficile*, and enteropathogenic *E. coli*), and they were microscopically examined fresh and after staining for protozoa. Immunochromatography was used, when required, to detect rotavirus or adenovirus. Only samples that were negative for these pathogens were included in the study. None of the patients selected had been involved in a food-borne outbreak or had reported any severe gastrointestinal pathology.

**Strains, bacteriophages, and media.** Laboratory *E. coli* strain C600, *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, and *Shigella sonnei* strain 866 (15) were used as *stx*-negative bacterial hosts to detect and propagate Stx2 phages. *E. coli* strain WG5 (ATCC 700078) (16) was used as a host to enumerate somatic coliphages according to standard ISO procedures (16). The *E. coli* C600 (pGEM::*stx*<sub>2</sub>) (17) construct was used for the standards in the *stx* quantitative PCR (qPCR) assay. Luria-Bertani (LB) broth or LB agar was used for culturing of bacteria and phage assays.

Received 10 April 2013 Accepted 3 June 2013

Published ahead of print 7 June 2013

Address correspondence to Maite Muniesa, mmuniesa@ub.edu.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01158-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01158-13

TABLE 1 Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5'–3')	Characteristic	Size (bp)	Reference
S2Aup S2Alp	ATGAAGTGTATATTATTA TTCTTCATGCTTAACCTCT	<i>stx</i> <sub>2</sub> A fragment	979	42
UP378 LP378	GCGTTTTGACCATCTTCGT ACAGGAGCAGTTTCAGACAG	378-bp <i>stx</i> <sub>2</sub> A fragment	378	12
27f 1492r	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG TACGGCTACCTTGTTACGACTT	Eubacterial 16S rRNA gene	1,503	43
STX-Any f STX-Any r STX-Any probe	ACGGACAGCAGTTATACCACTCT ACGTTCCGGAATGCAAATCAG FAM-CCAGCGCTGCGACACG-NFQ	Real-time PCR for <i>stx</i> <sub>2</sub>	65	17

**Purification of bacteriophages.** Fecal samples were homogenized at a 1:5 (wt/vol) dilution in phosphate-buffered saline (PBS) by magnetic stirring for 15 min. The samples were then centrifuged at  $3,000 \times g$ , and the supernatant was filtered through low-protein-binding 0.22- $\mu$ m-pore-size membrane filters (Millex-GP; Millipore, Bedford, MA). When necessary, several filter units were used to filter the whole volume. When necessary for DNA extraction, phages were 100-fold concentrated by means of protein concentrators (100-kDa Amicon ultracentrifugal filter units; Millipore, Bedford, MA) according to the manufacturer's instructions. The samples were treated with DNase (100 units/ml of the phage lysate) to eliminate DNA outside the phage particles. After treatment, DNase was inactivated by heating.

**Bacteriophage propagation in enrichment cultures.** Bacteriophages purified from 20 of the stool samples were used to evaluate the infectivity of the Stx phages present in the samples. Homogenate containing the phages was prepared as described above. Five milliliters of the phage suspension was used to enumerate the Stx phages present in the samples. Five milliliters of the phage suspension was mixed with 0.5 ml of a log-phase culture of each host strain (*E. coli* C600, *E. coli* O157:H7 [*stx* negative], or *S. sonnei* 866), and LB broth was added to a final volume of 20 ml. The cultures were incubated by shaking for 18 h at 37°C. Phages were purified from the supernatants of the enrichment cultures, and phage DNA was extracted and used as the template for quantification of *stx* gene copies (GC) by qPCR. Stx phages were considered propagated when a significant ( $P < 0.05$ ) increase in GC was observed in the supernatant from the enrichment cultures compared to the original homogenate.

**Plaque assay.** One milliliter of the supernatant from the enrichment cultures that had previously been filtered and DNase treated was used to screen infectious Stx phages by the spot test method. Briefly, 0.5 ml of an exponentially growing host bacterium culture, containing approximately  $2 \times 10^8$  cells per ml, was added to 100  $\mu$ l of 0.1 M CaCl<sub>2</sub> and incubated for 30 min at 37°C. The suspension was then mixed with 3 ml of LB top agar containing 5% sterile glycerol (18), poured onto LB agar plates, gently mixed, spread onto the LB agar plates, and allowed to dry. A 10- $\mu$ l drop of each phage suspension was then carefully spotted onto the bacterial lawn. When the suspension had dried, the plates were incubated (right side up) for 18 h at 37°C. A 10-fold serial dilution of the phage suspension was performed for phage enumeration. One hundred microliters of each dilution was mixed with 100  $\mu$ l of 0.1 M CaCl<sub>2</sub> and 500  $\mu$ l of a log-phase culture of the host strains and incubated for 30 min at 37°C.

**Screening for plaques of lysis generated by Stx phages.** To determine the presence of *stx*<sub>2</sub>, the plaques were transferred onto a nylon membrane (Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech, Spain) according to standard procedures (19). The membranes were hybridized at 65°C with a digoxigenin (DIG)-labeled *stx*<sub>2</sub> A probe prepared as described previously (15). Stringent hybridization was achieved with the DIG DNA labeling and detection kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain), according to the manufacturer's instructions.

**Phage DNA extraction.** DNA from purified Stx phages was isolated by proteinase K digestion and phenol-chloroform (1:1, vol/vol) treatment (19). The phenol-chloroform–phage lysate mixture was added to Phase Lock Gel tubes (5-Prime; VWR International, Spain) and centrifuged according to the manufacturer's instructions. DNA from the supernatant was precipitated by using 100% ethanol and 3 M sodium acetate, and the volume was adjusted to 50  $\mu$ l. The purified DNA was evaluated by agarose (0.8%) gel electrophoresis, and bands were visualized by ethidium bromide staining. The concentration and purity of extracted phage DNA were determined by using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE).

**PCR procedures.** The oligonucleotides used are summarized in Table 1. Conventional PCRs were performed by using a GeneAmp 2700 PCR system (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). When necessary, PCR products were purified by using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen Inc., Valencia, CA), according to the manufacturer's instructions.

Real-time qPCR assays for *stx*<sub>2</sub> were used to quantify *stx* GC in the phage DNA. All primers and TaqMan hydrolysis probes used in the qPCR assays were commercially synthesized by Applied Biosystems. Minor-groove binding probes with a FAM (6-carboxyfluorescein) reporter and a nonfluorescent quencher (NFQ) (Table 1) were used. The primers and probes (900 nM for primers and 200 nM for the TaqMan probe) were used under standard conditions with a Step-One real-time PCR system (Applied Biosystems, Spain), as previously described (17). To prepare the standard curves, a 378-bp fragment of *stx*<sub>2</sub> subunit A was cloned into a pGEM vector. The *stx* qPCR assay has an efficiency of 94% to 100% and a detection limit of 5.29 *stx* copies (17). To screen for PCR inhibition, the DNA isolated from the samples was spiked with dilutions of the standard, and the results were compared to the true number of GC of *stx* in the standards. No inhibition of the PCR by the samples was detected.

To exclude the possibility that DNA from a nonviral origin was amplified in the qPCR, control experiments were performed during phage DNA extraction. Aliquots of the samples were taken after DNase treatment but before the phage DNA was extracted from the capsid. These aliquots were used as the template for conventional PCR amplification of eubacterial 16S rRNA genes and also for qPCR amplification of *stx*. These controls had to be negative to confirm that the samples were free of bacterial DNA or nonencapsidated DNA. These control experiments were performed for all the samples tested.

**Sequencing.** Sequencing of the PCR amplicons obtained with phage DNA using combinations of primers S2Aup/S2Alp and UP378/LP378 (Table 1) was performed with an ABI Prism BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) in an ABI Prism 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, Barcelona, Spain), according to the manufacturer's instructions. All sequencing was performed in duplicate.

**Statistics.** Statistical tests were performed by using Statistical Package for Social Science (SPSS) software. A paired Student *t* test was used to

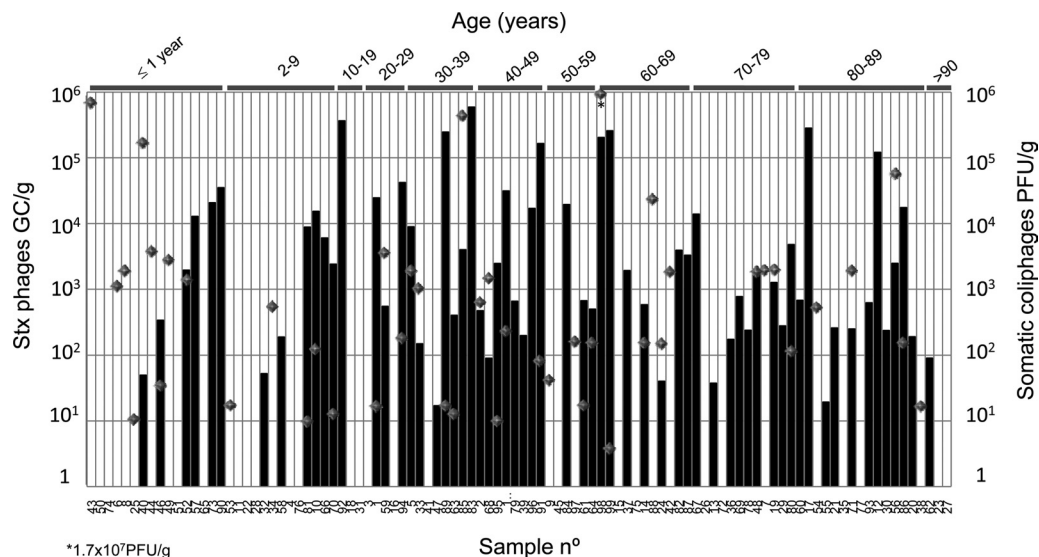


FIG 1 Quantification of Stx2 bacteriophages (GC/g of feces) (black bars) and infectious somatic coliphages (PFU/g) (gray diamonds) in 100 human fecal samples.

evaluate the differences between Stx phage GC before and after enrichment. Stx phages were considered to have propagated by enrichment when their levels were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those quantified before the enrichment. The chi-square test was used to compare the frequency of Stx phages in both adults (aged  $>19$  years) and nonadults (aged  $\leq 19$  years).

## RESULTS

Somatic coliphages are virulent phages that infect *E. coli*, and they were included as a reference for the densities of free *E. coli* phages present in the samples. Somatic coliphages were detected in 46% of the samples, with values ranging from 5 to  $1.7 \times 10^7$  PFU/g of feces, consistent with previous reports (20) (Fig. 1).

**Quantification of Stx phages.** Phage DNA was extracted from stool samples. As explained in Materials and Methods, an aliquot of the sample taken after DNase treatment and before desencapsulation was used as a template for the PCR of eubacterial 16S rRNA genes (Table 1) and qPCR of *stx*<sub>2</sub>. Both controls were negative, confirming the total removal of nonencapsidated DNA.

The results showed that 62% of the samples contained *stx*<sub>2</sub> in the isolated phage DNA, with an average value of  $2.6 \times 10^4$  Stx phages/g (from  $17.1$  to  $6.0 \times 10^5$ ). Results for Stx phages/g of feces are presented in relation to the age of the person from whom the stool sample was obtained (Fig. 1). As indicated above, samples were taken from healthy humans who did not present any of the symptoms associated with infection by STEC or any other symptoms that could be associated with an enteric disease (such as renal failure or colitis). All the samples were negative in microbiological studies. Adults (aged  $>19$  years) showed a significantly higher frequency of carriage of Stx phages than nonadults ( $\leq 19$  years) ( $\chi^2 = 7.66$ ; degree of freedom = 1;  $P = 0.05$ ).

Subunit A of Stx in phage DNA isolated from some of the positive stool samples was amplified by conventional PCR. Amplicons were visualized by agarose gel electrophoresis. Eleven amplicons showed a clear band and were sequenced. Most sequences belonged to *stx*<sub>2</sub>, although some showed homology with other *stx*<sub>2</sub> variants (Table 2). Since the fragment of the A subunit sequenced

was short (400 to 700 bp) (see the supplemental material), the presence of phages carrying *stx*<sub>2</sub> variants cannot be excluded.

**Infectivity of Stx phages.** To assess the infectivity of Stx phages, we evaluated their abilities to propagate in three *stx*-negative bacterial host strains. We compared the  $\log_{10}$  densities of Stx phages (*stx* GC in phage DNA) quantified from the homogenate of the original sample with the densities of Stx phages obtained after the propagation of phages in bacterial enrichment cultures (Table 3).

We observed a significant ( $P < 0.05$ ) increase in the densities of Stx phages after their propagation in at least one of the host strains for 95% of the samples. Only 1 of the 20 samples evaluated (sample 98) showed no propagation of Stx phages. Sample 98 showed the highest levels of somatic coliphages ( $1.7 \times 10^7$  PFU/g) (Fig. 1). The increase in densities indicates that the Stx phages were infective, although the results varied depending on the sample and the host strain. Comparing results between the three hosts used, *E. coli* C600 showed Stx phage propagation with only 35% of the samples, while *E. coli* O157:H7 and *S. sonnei* 866 showed propagation with 80% and 75% of the samples, respectively. Some samples showed a high level of propagation, while others showed only a slight increase. Some samples contained phages able to propagate in all three strains (e.g., sample 81, which showed the highest densities of Stx phages after enrichment in the three strains), while others showed propagation in only one of the strains (e.g., samples 85, 86, and 97 showed propagation of Stx phages only in *S. sonnei*, or samples 90, 94, and 100 showed propagation only in *E. coli* O157:H7).

**Evaluation of plaques of lysis generated by Stx phages.** The presence of infectious Stx phages in the samples and in the supernatants of the enrichment cultures from the same set of 20 samples described in Table 3 was evaluated by a plaque assay using the three host strains and hybridization with the *stx*<sub>2</sub> probe. Plaques were observed in most plates but were probably formed by non-Stx phages. After hybridization with the *stx*<sub>2</sub> probe, we observed positive signals by using phages from sample 97 propagated in *S.*

TABLE 2 Sequence variants corresponding to the amplicon of the *stx*<sub>2</sub> A subunit obtained from the phage DNA of 11 positive samples

Sample	GC/g	<i>stx</i> <sub>2</sub> variant	Homology (%)	Sequence homologue	GenBank accession no.
5	$9.0 \times 10^3$	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	95	<i>E. coli</i> O157:H7	AB761230
29	$3.0 \times 10^2$	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2d</sub>	95	<i>E. coli</i> ONT:NM <i>E. coli</i> O8:H19	JX206445 DQ235775
36	$1.7 \times 10^2$	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2v</sub> <i>stx</i> <sub>2d</sub>	95	<i>E. coli</i> ONT:NM <i>E. coli</i> O130:H11 <i>E. coli</i> O8:H19	JX206445 FM998861 DQ235775
37	$1.9 \times 10^3$	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2v</sub>	99	<i>E. coli</i> ONT:NM <i>E. coli</i> O8:H19	JX206445 DQ235775
39	$2.0 \times 10^2$	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	94	<i>E. coli</i> O157:H7	AB761230
48	$1.6 \times 10^3$	<i>stx</i> <sub>2v</sub> <i>stx</i> <sub>2d</sub>	96	<i>E. coli</i> O130:H11 <i>E. coli</i> O8:H19	FM998861 DQ235775
58	$1.9 \times 10^2$	<i>stx</i> <sub>2</sub>	97	<i>E. coli</i> O104:H4	CP003301
59	$5.6 \times 10^2$	<i>stx</i> <sub>2</sub>	95	<i>E. coli</i> O103:H25 <i>E. coli</i> O104:H4	JQ011318 CP003301
61	$6.8 \times 10^2$	<i>stx</i> <sub>2</sub>	96	<i>E. coli</i> O104:H4 <i>E. coli</i> O157:H7	CP003301 CP001925
67	$1.4 \times 10^4$	<i>stx</i> <sub>2v</sub> <i>stx</i> <sub>2d</sub>	97	<i>E. coli</i> O130:H11 <i>E. coli</i> O8:H19	FM998861 DQ235775
73	$2.1 \times 10^4$	<i>stx</i> <sub>2</sub> <i>stx</i> <sub>2v</sub>	99	<i>E. coli</i> ONT:NM <i>E. coli</i> O8:H19	JX206445 DQ235775

*sonnei* enrichment cultures and using *S. sonnei* as the host for the plaque assay (Fig. 2). The titer was slightly lower than that reported in Table 3, probably because phages were stored at 4°C for 2 days between the experiments of propagation and the evaluation of plaques of lysis. Ten Stx-positive plaques were excised from the top layer of agar, suspended in 50 µl of double-distilled water, and processed for phage DNA extraction. The presence of *stx*<sub>2</sub> in the phage DNA isolated from the plaques was further confirmed by conventional PCR.

We did not detect any *stx*-positive lysogens with the host strains used, either in the Stx phage plaques or in the supernatant of the enrichment cultures.

## DISCUSSION

The occurrence of infections by STEC bacteria is not of major concern in the Barcelona area, where this study was performed, and only a few cases are reported per year (21). The incidence of such infections is generally low throughout Spain compared to other European countries (22). Despite this low incidence, STEC strains can be isolated from urban sewage in the Barcelona area although at very low densities (23). In addition, and as shown in previous reports, the prevalence of free Stx phages in sewage in Spain is high (11, 12), as in other countries (10, 13, 14, 24, 25).

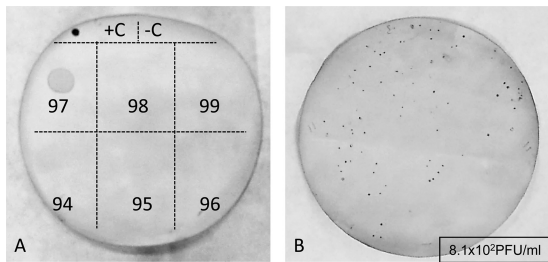
Some Stx phages detected in sewage are infectious and able to propagate and transduce *stx* in laboratory host strains (12). Analysis of salad and minced beef samples from the Barcelona area that were suitable for consumption according to European Union norms showed a high prevalence of free Stx phages (26). In several

TABLE 3 Increase in densities of Stx phages from stool samples after their propagation in cultures of the three host strains

Sample	Stx phage density (log <sub>10</sub> <i>stx</i> GC in phage DNA) in culture of <sup>a</sup> :		
	<i>E. coli</i> C600	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. sonnei</i> 866
81	3.05	3.46	3.25
82	0.13	0.52	1.21
83	0.10	0.41	NP
84	NP	0.93	0.51
85	NP	NP	0.95
86	NP	NP	0.26
87	1.00	1.36	0.94
88	NP	0.77	1.21
89	NP	0.16	0.15
90	NP	0.52	NP
91	NP	0.50	0.96
92	NP	0.55	0.38
93	1.90	2.42	0.84
94	NP	0.59	NP
95	0.94	1.38	0.28
96	0.42	0.62	0.15
97	NP	NP	3.06
98	NP	NP	NP
99	NP	0.16	0.10
100	NP	1.01	NP

<sup>a</sup> NP, not propagated. No significant increase ( $P > 0.05$ ) was observed in the densities of Stx phages after enrichment culture.





**FIG 2** Plaques of Stx phages obtained from the *S. sonnei* enrichment culture of phages from stool samples and using *S. sonnei* as host strain. (A) First screening using a drop of phages purified from the supernatants of enrichment cultures of samples 94 to 99. (B) Plaque assay performed with a 1/10 dilution of the phages purified from the supernatant of enrichment of sample 97. Plaques were detected after hybridization with a DIG-*stx*<sub>2</sub> A probe. +C, phage 933W DNA; -C, *S. sonnei* DNA.

samples, Stx phages proved to be infectious due to their ability to propagate in laboratory *E. coli* and *Shigella* strains (26). This and previous studies by our group have focused on Stx2 bacteriophages, but studies are needed to evaluate the occurrence of infectious phages encoding Stx1.

Previous findings suggested that Stx phages circulating in the healthy population could be ingested with certain foods and excreted in feces. They could then be detected in environments contaminated with human or animal feces. We speculated that the origin of Stx phages found in sewage could be a reservoir of lysogenic STEC, or they could be free phages that have been directly excreted in feces. In the present study, we demonstrate that Stx phages are directly excreted in feces, and to the best of our knowledge, this is the first study to provide such evidence. The presence of Stx phages in these samples, however, would not necessarily correspond to an outbreak of a pathogenic STEC strain.

Adults showed a higher frequency of Stx phages than younger individuals. This difference could be attributed to a more complex diet of adults and to the increasing chances of ingestion of Stx phages over a lifetime.

Other points that should also be considered are that susceptibility to hemolytic-uremic syndrome (HUS) is higher for children than for adults (27) and that induction of Stx phages from their bacterial hosts could increase the expression of Stx. Accordingly, large amounts of Stx phages would likely correlate with higher risks of HUS in young individuals. As our stool samples were obtained from healthy individuals without HUS, the incidence of Stx phages in young individuals was not expected to be high.

Our findings are in line with previous studies reporting the spread of STEC in healthy individuals (28–30) and the occurrence of *stx* genes in stool samples in the general population (31). In two of those studies (29, 31), *stx*-positive results were obtained in a first screening by PCR. Considering the methods described in those reports, it cannot be excluded that those authors detected Stx phages in addition to the STEC strains isolated.

The Stx phages in some of the samples in our study were infectious and therefore able to transduce the gene. Only one sample showed no propagation, but it had the largest number of lytic phages. Lytic phages other than Stx phages in the homogenate could have caused the lysis of the host strain before the Stx phages had the chance to replicate. As estimated in previous studies (17), the ratio of infectious Stx phages (by plaque blot assay) to total Stx phages (by qPCR) is between 1/10 and 1/1,000, depending on the

Stx phage and the bacterial host strain. If we apply this estimate to the stool samples, those with densities of Stx phages exceeding  $10^2$  GC/g (Fig. 1) could be expected to present infectious Stx phages.

Although we found infectious Stx phages and positive plaques for Stx phages, we did not detect Stx lysogens, supporting previous findings (26). Generation of Stx lysogens may occur at a low frequency, but not all Stx phages are capable of generating lysogens at the same frequency (15) or lysogenizing the same bacterial host strain (32). Although the host strains selected here have shown good results for Stx phage detection (15, 17, 26, 32), in previous studies, we found that few or no lysogens are generated, even under the best conditions, using Stx phages recently induced from a lysogenic strain (15). Several explanations can be given to explain why we did not detect Stx lysogens: the small number of Stx phages in the fecal samples, the fact that some Stx phages might not be infectious, the possibility that the strains used are not the optimal hosts, and the presence of other lytic, non-Stx phages. These other lytic phages could infect *E. coli* and cause the lysis of possible Stx lysogens before they can grow and be identified on an agar plate. The low generation of Stx lysogens is the main reason why antibiotic-resistant recombinant Stx phages have been used to study lysogeny in Stx phages. In this case, the use of selective antimicrobial agents would improve the detection of lysogens (32–35). Nevertheless, the fact that some Stx phages from feces in our study were infectious shows that they would be capable of transducing the gene under more favorable conditions. Under such circumstances, nonpathogenic flora could be converted into pathogenic strains by free Stx phages present in the gut (36). The low efficiency of the generation of lysogens with the Stx phages in this study could correlate with the low incidence of STEC infections and HUS in Spain (21, 22). However, our data are insufficient to confirm this hypothesis, and further studies are necessary.

In the light of these findings, another possibility should be considered. Most methods currently used to extract bacterial DNA from feces include the extraction of phage DNA, since most of them include a treatment with proteinase K, which eliminates phage capsid (19). Disease related to STEC is diagnosed by isolating cultivable STEC from fecal samples. Nevertheless, in some cases, cultures from fecal samples could be negative due to previous treatment with antimicrobial agents or to a disease diagnosed late in the course of the disease (37). In these cases, detection of *stx* using PCR, either conventional multiplex or real-time qPCR (38–40), would be an alternative. The fact that free Stx phages are excreted in the feces of healthy humans indicates that some individuals, as observed for STEC in animals (41), could be shedding free Stx phages, even though they are not colonized by STEC. However, in a clinical setting, a positive *stx* result from the molecular analysis of DNA in the samples will result in a positive diagnosis of STEC-related illness, even though STEC is not always the cause of disease. This false-positive result may hinder detection of the real pathogen.

In conclusion, taking into account the high prevalence of Stx phages in fecal samples from healthy individuals, diagnostic methods that could detect phage DNA from stool samples are likely unreliable for diagnosis of disease related to STEC strains.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (grants AGL2009-07576 and AGL2012-30880); the Ministry of



Education and Science, Instituto de Salud Carlos III, cofinanced by the European Development Regional Fund, A Way To Achieve Europe ERDF; the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (grant REIPI RD06/0008/0013); the Generalitat de Catalunya (grant 2009SGR1043); and a project of the RecerCaixa program (La Caixa). Alexandre Martínez-Castillo has an FPI grant from the Ministry of Education and Science.

## REFERENCES

- Erickson MC, Doyle MP. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 70:2426–2449.
- Herold S, Karch H, Schmidt H. 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages—genomes in motion. *Int. J. Med. Microbiol.* 294:115–121.
- O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226:694–696.
- Steyert SR, Sahl JW, Fraser CM, Teel LD, Scheutz F, Rasko DA. 2012. Comparative genomics and Stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:133. doi:10.3389/fcimb.2012.00133.
- Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:560–602.
- Xu X, McAteer SP, Tree JJ, Shaw DJ, Wolfson EB, Beatson SA, Roe AJ, Allison LJ, Chase-Topping ME, Mahajan A, Tozzoli R, Woolhouse ME, Morabito S, Gally DL. 2012. Lysogeny with Shiga toxin 2-encoding bacteriophages represses type III secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 8:e1002672. doi:10.1371/journal.ppat.1002672.
- L'Abée-Lund TM, Jørgensen HJ, O'Sullivan K, Bohlin J, Ligård G, Granum PE, Lindbäck T. 2012. The highly virulent 2006 Norwegian EHEC O103:H25 outbreak strain is related to the 2011 German O104:H4 outbreak strain. *PLoS One* 7:e31413. doi:10.1371/journal.pone.0031413.
- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* 11:671–676.
- Allison HE. 2007. Stx-phages: drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiol.* 2:165–174.
- Dumke R, Schroter-Bobsin U, Jacobs E, Roske I. 2006. Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:48–53.
- Imamovic L, Ballesté E, Jofre J, Muniesa M. 2010. Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5693–5701.
- Muniesa M, Jofre J. 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2443–2448.
- Rooks DJ, Yan Y, McDonald JE, Woodward MJ, McCarthy AJ, Allison HE. 2010. Development and validation of a qPCR-based method for quantifying Shiga toxin-encoding and other lambdoid bacteriophages. *Environ. Microbiol.* 12:1194–1204.
- Tanji Y, Mizoguchi K, Akitsu T, Morita M, Hori K, Unno H. 2002. Fate of coliphage in waste water treatment process and detection of phages carrying the Shiga toxin type 2 gene. *Water Sci. Technol.* 46(11–12):285–289.
- Muniesa M, Blanco JE, De Simón M, Serra-Moreno R, Blanch AR, Jofre J. 2004. Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* 150:2959–2971.
- Anonymous. 2000. ISO 10705-2: water quality. Detection and enumeration of bacteriophages—part 2: enumeration of somatic coliphages. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Imamovic L, Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M. 2010. Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. *J. Appl. Microbiol.* 108:1105–1114.
- Santos SB, Carvalho CM, Sillankorva S, Nicolau A, Ferreira EC, Azeredo J. 2009. The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiol.* 9:148. doi:10.1186/1471-2180-9-148.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Grabow WOK, Neubrech TE, Holtzhausen CS, Jofre J. 1995. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages. Excretion by humans and animals. *Water Sci. Technol.* 31(5–6):223–230.
- Generalitat de Catalunya Agència Catalana de Seguretat Alimentària. 2011. Informe de la situació d'*Escherichia coli* verotoxigen a Catalunya. Generalitat de Catalunya Agència Catalana de Seguretat Alimentària, Barcelona, Spain. [http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir2839/ecvt\\_catalunya\\_06-2011.pdf](http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir2839/ecvt_catalunya_06-2011.pdf).
- European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority. 2011. Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104. ECDC, Stockholm, Sweden.
- Blanch AR, García-Aljaro C, Muniesa M, Jofre J. 2003. Detection, enumeration and isolation of strains carrying the stx<sub>2</sub> gene from urban sewage. *Water Sci. Technol.* 47(3):109–116.
- Muniesa M, Jofre J. 2000. Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the Shiga toxin 2 gene in sewage from different countries. *FEMS Microbiol. Lett.* 183:197–200.
- Yan Y, Shi Y, Cao D, Meng X, Xia L, Sun J. 2011. Prevalence of Stx phages in environments of a pig farm and lysogenic infection of the field *Escherichia coli* O157 isolates with a recombinant converting phage. *Curr. Microbiol.* 62:458–464.
- Imamovic L, Muniesa M. 2011. Quantification and evaluation of infectivity of Shiga toxin-encoding bacteriophages in beef and salad. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3536–3540.
- Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295:405–418.
- Fujihara S, Arikawa K, Aota T, Tanaka H, Nakamura H, Wada T, Hase A, Nishikawa Y. 2009. Prevalence and properties of diarrheagenic *Escherichia coli* among healthy individuals in Osaka City, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62:318–323.
- Hong S, Oh KH, Cho SH, Kim JC, Park MS, Lim HS, Lee BK. 2009. Asymptomatic healthy slaughterhouse workers in South Korea carrying Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 56:41–47.
- Alikhani MY, Mirsalehian A, Fatollahzadeh B, Pourshafie MR, Aslani MM. 2007. Prevalence of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children with and without diarrhoea in Iran. *J. Health Popul. Nutr.* 25:88–93.
- Urdahl AM, Solheim HT, Vold L, Hasseltvedt V, Wasteson Y. 2013. Shiga toxin-encoding genes (stx genes) in human fecal samples. *APMIS* 121:202–210.
- Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, Jofre J, Muniesa M. 2006. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant phages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Mol. Biol.* 7:31. doi:10.1186/1471-2199-7-31.
- Cornick NA, Helgerson AF, Mai V, Ritchie JM, Acheson DW. 2006. *In vivo* transduction of an Stx-encoding phage in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5086–5088.
- James CE, Stanley KN, Allison HE, Flint HJ, Stewart CS, Sharp RJ, Saunders JR, McCarthy AJ. 2001. Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4335–4337.
- Schmidt H, Bielaszewska M, Karch H. 1999. Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3855–3861.
- Gamage SD, Strasser JE, Chalk CL, Weiss AA. 2003. Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin. *Infect. Immun.* 71:3107–3115.
- Paton AW, Paton JC. 1999. Direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37:3362–3365.
- Grys TE, Sloan LM, Rosenblatt JE, Patel R. 2009. Rapid and sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonenriched stool specimens by real-time PCR in comparison to enzyme immunoassay and culture. *J. Clin. Microbiol.* 47:2008–2012.
- Monday SR, Beisaw A, Feng PC. 2007. Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Mol. Cell. Probes* 21:308–311.

40. Paton JC, Paton AW. 2003. Methods for detection of STEC in humans: an overview. In Philpott D, Ebel F (ed), *Methods in molecular medicine*, vol 73. *Escherichia coli*: Shiga toxin methods and protocols. Humana Press Inc, Totowa, NJ.
41. Chase-Topping M, Gally D, Low C, Matthews L, Woolhouse M. 2008. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:904–912.
42. Muniesa M, de Simon M, Prats G, Ferrer D, Panella H, Jofre J. 2003. Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect. Immun.* 71:4554–4562.
43. Sander M, Schmieger H. 2001. Method for host-independent detection of generalized transducing bacteriophages in natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1490–1493.



## **4.2 CAPITULO 2:**

**Genes efectores de tipo III y otros factores de virulencia en *Escherichia coli* productoras de la toxina Shiga aisladas en agua residual**



## Genes efectores de tipo III y otros factores de virulencia en *Escherichia coli* productoras de la toxina Shiga aisladas en agua residual

Alexandre Martínez-Castillo, Anna Allué-Guardia, Ghizlane Dahbi, Jorge Blanco, Kristina Creuzburg, Herbert Schmidt y Maite Muniesa.

Enviromental Microbiology Reports 2011;4:147-155

### Introducción

Los análisis moleculares de los genes de virulencia se utilizan para detectar su frecuencia y evaluar el riesgo de provocar una infección humana a partir de bacterias portadoras de dichos genes (Beutin *et al.*, 1997; Coombes *et al.*, 2008; Creuzburg *et al.*, 2011; Ogura *et al.*, 2009; Prager *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2002).

Dentro del género de *E. coli* hay diferentes subgrupos patógenos, como las *E.coli* portadoras de la toxina Shiga (STEC). Las STEC codifican los genes de la toxina Shiga (*stx*), que están situados en el genoma de un bacteriófago atemperado. Hay dos tipos de toxinas: Stx1 y Stx2. La Stx1 se encuentra altamente conservada, con tres subtipos: Stx1a, 1c o 1d, mientras que de Stx2 hay 6 subtipos: Stx2, 2c, 2d, 2e, 2f o 2g.(Schmidt *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2003; Creuzburg *et al.*, 2005).

Aunque la Stx es el factor que define la virulencia en estas cepas de *E. coli*, se necesita una serie de factores adicionales para producir la infección. La enterohemolisina (*hlyA*) (Schmidt *et al.*, 1995), genes implicados en el proceso de adhesión (McDaniel *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 2001) y el sistema de secreción de proteínas efectoras tipo III (T3SS)(Tobe *et al.*, 2006; Tree *et al.*, 2009) . El T3SS, es un canal que usan las bacterias para transportar proteínas efectoras de la bacteria a la célula eucariota y se encuentra codificado

en una isla de patogenicidad denominada LEE (“Locus of enterocyte effacement”). LEE codifica para las proteínas encargadas de las lesiones de adhesión y borrado (attaching/effacing o A/E) y para el gen *eae* que codifica para la intimina, proteína necesaria para la unión al enterocito. Además, LEE codifica una serie de proteínas efectoras denominadas Esp (“*E. coli secreted protein*”) involucradas en otras funciones (Tobe *et al.*, 2006). En *E. coli*, se han descrito 32 proteínas efectoras codificadas en distintas islas de patogenicidad, plásmidos o bacteriófagos (Tobe *et al.*, 2006).

Sin embargo, hay cepas LEE negativas que suplen las funciones localizadas en LEE mediante otros genes, por ejemplo, el gen *saa*, que codifica para Saa (STEC autoagglutinating adhesin) encargada de funciones de adhesión (Paton *et al.*, 2001).

Un estudio reciente ha relacionado la distribución de 19 proteínas efectoras de tipos III, detectadas en *E. coli* patogénicas aisladas de muestras humanas, animales y de alimentos, con la virulencia de las cepas y su capacidad de causar diarreas o síndrome urémico hemolítico (SUH) (Creuzburg *et al.*, 2011)

## Objetivo

Evaluar la incidencia y la distribución de los factores de virulencia del estudio anterior (Creuzburg *et al.*, 2011), a partir de 103 cepas STEC *stx*<sub>2</sub> positivas aisladas en aguas residuales y que por tanto no tenían relación directa con casos clínicos.

## Resultados y discusión

Se partió de una colección de 103 cepas de *E. coli stx* positivas, procedentes de agua residual de vaca (61), humana (27), cerdo (6) y una mezcla de diferentes orígenes fecales, vaca, cabra, cordero y humano (9) (Blanch *et al.*, 2003).

Por un lado, se analizaron los subtipos  $stx_2$  en las cepas. Se observó que sólo 7 cepas poseían dos subtipos de  $stx_2$  a la vez; la combinación  $stx_{2c}$ - $stx_{2d}$  se detectó en 6 cepas, y  $stx_{2c}$ - $stx_{2d}$  en una. Los subtipos  $stx_2$  y  $stx_{2c}$  fueron los más frecuentes. El subtipo  $stx_{2d}$  sólo se observó en muestras de agua residual humana y en las muestras con contaminación fecal mezclada (donde una parte provenía de origen humano). En las muestras de origen porcino el único subtipo que se detectó fue  $stx_{2e}$ , tal como se describió anteriormente (Marques *et al.*, 1987).

Se observó que 38 cepas eran capaces de producir la toxina Stx2 y por lo tanto eran potencialmente más virulentas. Las cepas de origen porcino no fueron capaces de producir la toxina.

Por otro lado, se analizó la prevalencia de 22 genes de virulencia y de la toxina  $stx_1$  en las cepas. En el 53,4% de las cepas no se detectó ningún gen de virulencia a parte de  $stx_2$ . En un 83.3% de cepas de origen porcino y en un 66% de cepas de origen fecal mixto no se detectó ningún gen de virulencia. En 16% de las cepas que poseían algún gen de virulencia aparte del  $stx_2$ , eran además capaces de producir la toxina Stx2, y por lo tanto las potencialmente más patógenas.

De las cepas que codificaban para algún gen de virulencia, el 77% de ellas codificaron para uno o dos genes y el 23% para tres o más. La prevalencia de genes no localizados en LEE fue muy superior o los presentes en LEE (7%), por lo que estas cepas no serían potencialmente tan patógenas

Los serotipos O157:H7 y O157:H- fueron los más predominantes, siendo también en los que se encontraba a la vez un mayor número de genes de virulencia.

El gen *hlyA* fue el más abundante, seguido por dos genes no codificados en LEE: *nleC* y *saa*. Al realizar un matriz en la que se comparó cada gen y su presencia simultánea con el resto de genes, se observaron dos clusters. Un cluster caracterizado por genes codificados en LEE, como *map*, *espF* y *espG* y otros genes no codificados en LEE como *espJ*, *espM*, *nleB1* o *nleE*. Algunas asociaciones de genes no codificados en LEE con genes LEE ya se habían



descrito anteriormente, como el caso de *nleB* con cepas patógenas de EHEC y EPEC que son LEE positivas (Coombes *et al.*, 2008).

En contraste, el otro cluster estaba caracterizado por los genes *stx<sub>1</sub>*, *cdt*, *hlyA*, *saa* y *cif*. Este cluster agruparía a genes que se movilizan independientemente en elementos genéticos móviles. Por ejemplo, *cdt* y *stx<sub>1</sub>*, que están codificados en el genoma de bacteriófagos, mientras que *hlyA*, *saa* y *cif* en plásmidos. El gen *saa* no se encontró simultáneamente con otros genes, excepto *hlyA*, lo que sugería que se moviliza independientemente, como *cdt*. El gen *saa* no se detectó en ninguna cepa junto a genes codiciados dentro de LEE.

En la prevalencia de los genes de virulencia no se observaron relaciones filogénicas entre las cepas, sino que la distribución aleatoria sugiere una adquisición independiente por elementos genéticos móviles (fagos o islas de patogenicidad), que serían los causantes de la divergencia.

Los resultados mostraron que el agua residual presenta un reservorio de genes de virulencia que pueden ser movilizados entre las poblaciones de *E. coli* no patógenas y las cepas patógenas. En el estudio se observaron lo que parecían estadios intermedios en la evolución de las cepas de *E. coli* durante su adquisición o pérdida de genes de virulencia, que podría generar nuevos patógenos si reúneran los genes necesarios en una misma cepa.

# Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater

Alexandre Martínez-Castillo,<sup>1</sup> Anna Allué-Guardia,<sup>1</sup> Ghizlane Dahbi,<sup>2</sup> Jorge Blanco,<sup>2</sup> Kristina Creuzburg,<sup>3</sup> Herbert Schmidt<sup>3</sup> and Maite Muniesa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, 08028 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Science, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

<sup>3</sup>Institute of Food Science and Biotechnology, Department of Food Microbiology, University of Hohenheim, Garbenstrasse 28, 70599 Stuttgart, Germany.

## Summary

**Pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains share the genes encoding Shiga toxins (*stx*) and many other virulence factors. The classification and evolutionary studies of pathogenic *E. coli* based on their virulence genes have been conducted with *E. coli* isolated from human and animal infections or outbreaks. In this study, we used 103 STEC strains isolated from faecally polluted water environments to analyse 23 virulence genes (*stx*<sub>1</sub>, *cdt*, *hlyA*, *saa*, *eae*, three type III effector genes encoded within the locus of enterocyte effacement (LEE) and 15 non-LEE-encoded type III effector genes). Despite the presence of several *stx*<sub>2</sub> variants, our isolates demonstrated low prevalence of the virulence genes (only 46.6% of the strains were positive for virulence determinants). Among these, the largest repertoire was found in a few O157:H7 isolates (most from cattle wastewater and one from sewage), while other serotypes showed fewer virulence determinants. The occurrence of most virulence genes seemed to be independent from one another. This was clear for *hlyA* (the most prevalent), *cdt* and *cif* (the least prevalent). Other effector genes, could be found or not in combination with others, suggesting that they can be**

**mobilized independently. Our data suggest that *E. coli* strains can evolve separately by independently acquiring mobile genetic elements.**

## Introduction

Molecular analysis of major virulence factor genes is commonly used for the detection and evolutionary studies of pathogenic *Escherichia coli*. These studies are conducted to evaluate the putative risk of these strains for human infection (Beutin *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; Coombes *et al.*, 2008; Ogura *et al.*, 2009; Prager *et al.*, 2010; Creuzburg *et al.*, 2011). The information available mostly refers to isolates associated with human or animal infection or strains isolated from food samples involved in sporadic cases or outbreaks.

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains belong to a subgroup of pathogenic *E. coli* that is characterized by the expression of Shiga toxin genes (*stx*) (Nataro and Kaper, 1998). The *Stx* family comprises the two major toxins *Stx1* and *Stx2*. While *Stx1* is highly conserved, *Stx2* has distinct variants (*Stx2*, 2c, 2d, 2e, 2f or 2g) (Nakao and Takeda, 2000; Schmidt *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2003). Shiga toxin genes are located in the genomes of bacteriophages, which might have contributed to the spread of *stx* among the bacterial population (Herold *et al.*, 2004; Muniesa *et al.*, 2004).

Although *Stx* is the main factor that defines the virulence of these strains, its presence is not sufficient to cause infection. Other major virulence factors ascribed to STEC strains include the plasmid-encoded enterohaemolysin (*hlyA*) (Schmidt *et al.*, 1995), genes enabling bacterial adhesion (McDaniel *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 2001) and genes that encode type III effector proteins (Tobe *et al.*, 2006; Tree *et al.*, 2009). A type III secretion system (T3SS) allows effector proteins to pass through the bacterial membranes and then through a channel into the targeted eukaryotic cell. These effectors manipulate host cell signalling pathways, presumably to the advantage of the colonizing bacterium (Tree *et al.*, 2009). In enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC), many structural and regulatory genes of the T3SS as well as genes encoding effectors are located within the pathogenicity island (PAI) referred

Received 9 May, 2011; accepted 22 November, 2011. \*For correspondence. E-mail mmuniesa@ub.edu; Tel. (+34) 93 4039386; Fax (+34) 93 4039047.

to as LEE (for *locus of enterocyte effacement*) (McDaniel *et al.*, 1995). The LEE is responsible for the attaching-effacing (A/E) lesions in the small and large intestine. It is therefore considered a relevant virulence determinant in *E. coli*. The A/E lesion is characterized by the loss of host cell microvilli (effacement) and intimate attachment of the bacterium to the host membrane on a pedestal of polymerized cytoskeletal elements (McDaniel *et al.*, 1995). The factor of the LEE cassette that promotes adherence is intimin, a product of the gene *eae* (Jerse *et al.*, 1990).

Attachment seems to be the primary function of the T3SS in EHEC, but other LEE-encoded proteins, such as Esp (*E. coli* secreted protein) effectors (Tobe *et al.*, 2006), are also involved in other functions (Table S1). In addition to the LEE-encoded effectors, there are at least a further 32 proteins encoded outside the LEE that can be secreted into cultured epithelial cells by the LEE-encoded T3SS (Tobe *et al.*, 2006). In LEE-negative strains lacking *eae*, the adhesion function is supplied by other factors, such as the auto-agglutinating adhesin encoded by the gene *saa* (Paton *et al.*, 2001).

A recent study evaluated the distribution of type III effector genes in pathogenic *E. coli* isolated from humans, animals and food, many of them causing diarrhoea or haemolytic uremic syndrome (HUS) (Creuzburg *et al.*, 2011). The study analysed 19 effector genes in a set of strains by multi-locus sequence typing, with the objective of classifying them into clusters and looking for correlation with regard to effector genes and virulence (ability to cause HUS). In the present study, we isolated and analysed *stx*<sub>2</sub>-positive STEC strains from wastewater polluted with faeces. Our aim was to evaluate the incidence of virulence factors, including effector genes described in the above mentioned study (Creuzburg *et al.*, 2011), in this set of STEC strains that was not associated with any outbreak or with a clinical setting.

## Results and discussion

A collection of 103 *stx*-positive *E. coli* were isolated in Catalonia (north-east of Spain), only on the basis of the presence of *stx*<sub>2</sub> (Blanch *et al.*, 2003). The collection comprises 61 strains from cattle wastewater, 27 from human wastewater (urban sewage), six from pig wastewater and nine corresponding to water samples with mixed faecal pollution (cattle, lamb and goat slaughterhouse and can also contain human pollution). These strains were not involved in any disease and were not isolated from sick animals or humans. Moreover, there had not been any remarkable incidences of STEC in our geographical area during the period of this study (2003–2009) (Anonymous, 2010). The collection included isolates described in a previous study (García-Aljaro *et al.*, 2005) and new ones and the isolates belonged to different serotypes

(Table S2). All isolates are independent and do not show a clonal relationship. The virulence determinants were analysed by PCR and sequencing (Table S3).

First, six *stx*<sub>2</sub> variants were analysed (Fig. 1) and were found to differ in their rate of occurrence. Only seven isolates harboured two *stx*<sub>2</sub> variants simultaneously; the combination *stx*<sub>2</sub> and *stx*<sub>2c</sub> was detected in six isolates while the combination *stx*<sub>2c</sub> and *stx*<sub>2d</sub> was detected in only one. The genes *stx*<sub>2</sub> and *stx*<sub>2c</sub> were the most frequently detected, followed by variants *stx*<sub>2e</sub> (exclusive in pig samples), and *stx*<sub>2g</sub>, which occurred very frequently in cattle isolates but not in those of humans. Variant *stx*<sub>2d</sub> was found almost exclusively in human isolates and in those from mixed faecal pollution that could have also included human faecal pollution. Only one isolate from human wastewater harboured the variant *stx*<sub>2f</sub> (Fig. 1). The occurrence of each variant in a given origin or serotype was consistent with those reported in previous studies. For example, *stx*<sub>2e</sub> is a variant predominantly found in pigs (Marques *et al.*, 1987), *stx*<sub>2c</sub> show a high prevalence in cattle (Beutin *et al.*, 1997), *stx*<sub>2d</sub> is associated with strains isolated from human (Wang *et al.*, 2002), and variant *stx*<sub>2g</sub> was found in cattle, which is in accordance with previous reports that have indicated this variant as a new evolutionary event that is spreading (Prager *et al.*, 2010).

From these strains, the production of Stx2 was observed in 38 isolates. Thirty corresponded to isolates of water contaminated with cattle faeces (2 *stx*<sub>2</sub>, 20 *stx*<sub>2c</sub>, 5 *stx*<sub>2g</sub>, 2 *stx*<sub>2</sub> + *stx*<sub>2c</sub> and 1 *stx*<sub>2c</sub> + *stx*<sub>2d</sub>), seven were human wastewater isolates (2 *stx*<sub>2</sub>, 2 *stx*<sub>2c</sub>, 2 *stx*<sub>2</sub> + *stx*<sub>2c</sub> and 1 *stx*<sub>2f</sub>) and one was from mixed faecal origin harbouring *stx*<sub>2g</sub>. Stx2 production was not observed in isolates deriving from water contaminated with pig faeces. It would be useful to determine whether the production of the toxin indicates that these strains are able to conduct a successful infection.

The presence of *stx*<sub>1</sub> and its product were also evaluated in the STEC strains (Fig. 1). The seven *stx*<sub>1</sub>-positive strains were shown to express Stx1. The *stx*<sub>1</sub> was considered and presented as an additional virulence factor in the following analysis.

### *Prevalence of virulence genes and distribution by serotypes*

In addition to the *stx*<sub>1</sub>, the prevalence of further 22 virulence genes, which comprised *saa*, *hlyA*, *cdt*, *eae* and 18 effector genes, was analysed (Table S1). The prevalence of the 23 virulence genes analysed was low. From the 103 STEC strains, 53.4% did not contain any virulence gene (negative isolates) other than the *stx*<sub>2</sub> used as the basis for isolating these strains (Table 1). Within each group sharing the same origin, negative isolates represented

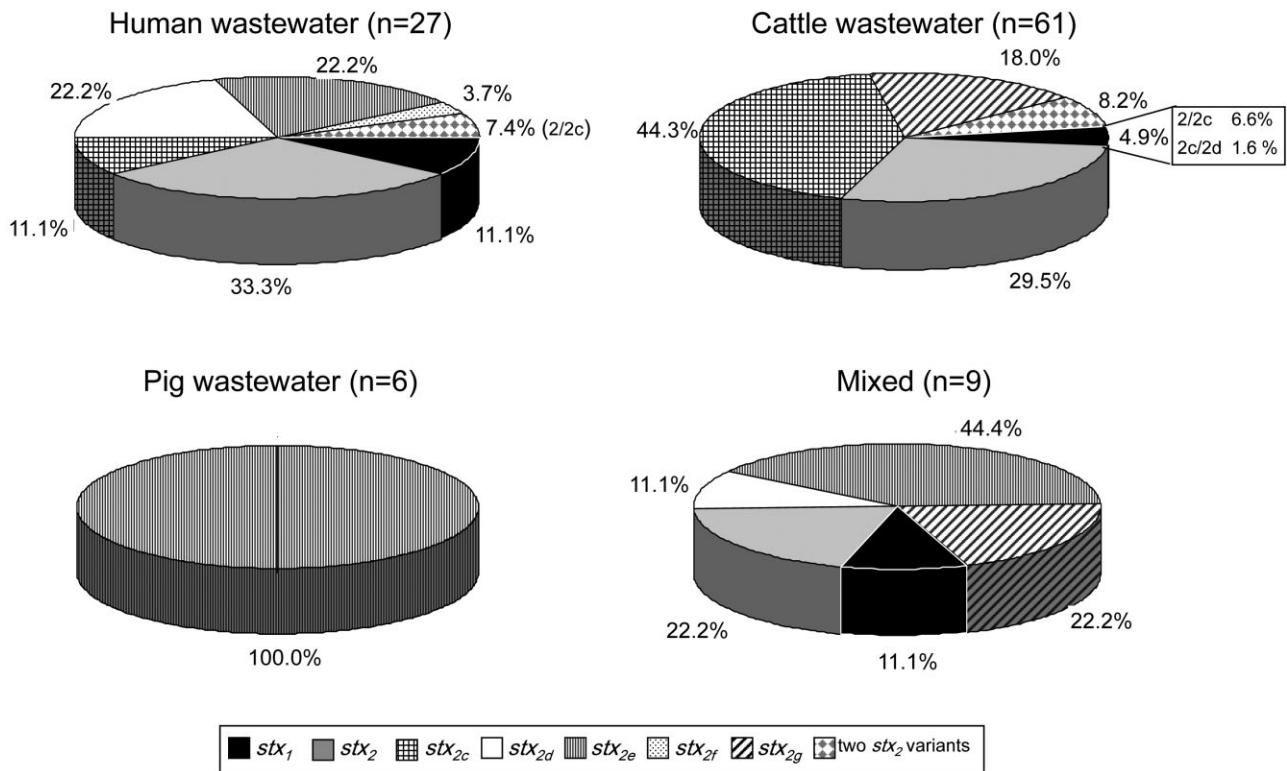


Fig. 1. Distribution (%) of *stx*<sub>2</sub> variants and *stx*<sub>1</sub> in the isolates of each wastewater origin among the 103 analysed isolates.

47.5% of cattle wastewater isolates, 55.5% of human wastewater isolates, 83.3% of the strains from pig wastewater and 66.6% of the strains with mixed faecal origin. Despite the lack of other virulence genes, 16 isolates were still able to express Stx2 (Table 1) and were therefore potentially pathogenic.

Among the 48 strains containing some virulence genes (positive isolates), 77.0% had only one or two genes (Fig. S1A) and only 23.0% of the strains harboured three or more virulence determinants (Table 2). Among the positive group, 7% harboured *eae* and the other LEE-encoded genes (*map*, *espF*, *espG*), but the prevalence of non-LEE-encoded effector genes was higher in comparison, which supports the fact that these strains are not associated with pathogenicity, since the combination of *stx*<sub>2</sub> and *eae* would lead to a highly virulent strain (Friedrich *et al.*, 2002).

Distribution by origins (Fig. S1B) showed that isolates from cattle wastewater carried the largest number of virulence genes, followed by human wastewater isolates, although these two groups were also the most numerous in the study (Fig. S1B). In the set of positive samples, serotypes O157:H7 and O157:H – displayed the largest number of virulence genes, followed by serotype O156:H8 (Table 2). Isolates of other serotypes possessed less than 10 of the determined virulence genes (Fig. S1). As expected, O157:H7 exhibited the largest battery

of virulence factors, which allowed combination among them. If pathogenicity of these strains could be demonstrated, this group of isolates would fit with the seropathotype A classification (Karmali *et al.*, 2003). The environmental source from which this serotype is most frequently isolated is cattle (Nataro and Kaper, 1998), although it should be noted that strains obtained from cattle wastewater were the most abundant in our collection. Only one O157:H7 isolate from wastewater of human origin (strain 128, Table 2) carried less virulence factors than the other O157 isolates. However, evolutionarily speaking, it is not possible to define whether the other virulence genes have been lost or have never been acquired by this isolate.

#### Occurrence and distribution of virulence genes in the environmental isolates

Comparisons of the occurrence of each gene in the strains demonstrated that *hlyA* was significantly ( $P < 0.05$ ) more abundant than the other genes (Fig. 2). In second position, the non-LEE-encoded effector gene *nleC* was detected in 13.6% of the strains. The *saa* gene was the third most abundant and found in 11.6% of the strains, being more frequent than the LEE-encoded *eae* (7.8%). The *cif* gene was only detected in 4.6% of the strains, resulting in being the least abundant, while *nleH1-2* was

**Table 1.** List of the environmental STEC strains showing the presence of *stx*<sub>2</sub> and no other analysed virulence genes.

N	Wastewater	Serotype	<i>stx</i> <sub>2</sub> variants	Stx production
29/61 <sup>a</sup>	Cattle	O2:H25 (9/11) <sup>a</sup>	<i>stx</i> <sub>2</sub> (3) or <i>stx</i> <sub>2g</sub> (6)	5/9
		O101:H9 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2</sub> (1)	0/1
		O136:H1 (1/2)	<i>stx</i> <sub>2g</sub> (1)	0/1
		O162:H7 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> (1)	0/1
		O171:H2 (13/17)	<i>stx</i> <sub>2</sub> (3) or <i>stx</i> <sub>2c</sub> (9) or <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> (1)	9/13
		O171:H – (1/1)	<i>stx</i> <sub>2</sub> (1)	0/1
		O181:H20 (2/3)	<i>stx</i> <sub>2</sub> (1) or <i>stx</i> <sub>2c</sub> (1)	1/2
		Ont:Hnt (1/1)	<i>stx</i> <sub>2c</sub> (1)	0/1
15/27	Human	O8:H9 (6/7)	<i>stx</i> <sub>2</sub> (4) or <i>stx</i> <sub>2e</sub> (2)	0/6
		O90:H – (2/3)	<i>stx</i> <sub>2d</sub> (2)	0/2
		O100:H – (1/1)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (1)	0/1
		O127:H – (1/2)	<i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> (1)	0/1
		O146:H – (1/1)	<i>stx</i> <sub>2</sub> (1)	1/1
		O171:H2 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2d</sub> (1)	0/1
		O174:H11 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (1)	0/1
		Ont:H2 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2</sub> (1)	0/1
		Ont:H9 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (1)	0/1
5/6	Pig	O2:H21 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (1)	0/1
		O8:H – (2/2)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (2)	0/2
		O26:H – (1/1)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (1)	0/1
		O54:H21 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (1)	0/1
6/9	Mixed	O9:H – (1/1)	<i>stx</i> <sub>2</sub> (1)	0/1
		O26:H – (1/1)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (1)	0/1
		Ont:H – (2/2)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (2)	0/2
		Ont:H21 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2e</sub> (1)	0/1
		Ont:H48 (1/1)	<i>stx</i> <sub>2</sub> (1)	0/1

a. Number of negative strains among all the strains tested from each origin or each serotype.

Detection of *stx* genes was performed by PCR as described in Table S3. The production of Shiga toxins (Stx1 and Stx2) in the isolates was tested using the commercial Duopath VT Detection Kit (Merck, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's instructions (Park *et al.*, 2003).

observed in 5.8% of the isolates (Fig. 2). Differences among the LEE-encoded (average occurrence of 8.7%) and non-LEE-encoded effector genes (average occurrence of 7.5%) were not significant ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2).

To compare the simultaneous occurrence of each virulence gene with others, a half-matrix was constructed (Fig. 3A). In the cells of this matrix, the number of isolates in which two genes (presented in the X and Y axis of the matrix) were found is indicated. The colour of the cells corresponds to the number of isolates, ranging from black (which corresponds to nine or eight isolates) to white (which indicates one or no isolate). Simultaneous evaluation of the occurrence of all virulence genes enabled hierarchical clustering (Fig. 3B). Two well-differentiated clusters can be observed: one is composed of *cif*, *stx*<sub>1</sub>, *saa*, *hlyA* and *cdt*, while the other cluster comprises *eae* and almost all the effector genes, distributed randomly depending on their occurrence in the isolates.

The genes that occurred always together were *map*, *espF* and *espG*, which were also in combination with other effector genes. Since *map*, *espF* and *espG* are all present within LEE, they could be considered as a single group. *eae*, also LEE-encoded, was found simultaneously with *map*, *espF* and *espG* with the exception of one strain, indicating that it can be lost or that the LEE could be

truncated (Creuzburg *et al.*, 2011). The non-LEE-encoded effector genes *espJ*, *espM*, *nleB2*, *nleC*, *nleD*, *nleE*, *nleF*, *nleH1-1* and *tccP* were predominantly found together with other genes in at least six strains, in particular with genes of the LEE-encoded effectors (Fig. 3A). The relationship between the other effector genes showed some association among them, but not as clear as that demonstrated by other authors. For example, *nleB1* and *nleE* were suspected to be located in the same prophage (Coombes *et al.*, 2008; Creuzburg *et al.*, 2011) and belong to the same O island (OI-122) (Bugarel *et al.*, 2011). These two genes were mostly found together in our strains, but not always (there were three isolates lacking either *nleB1* or *nleE*). Similarly, *nleH1-2*, *nleA* and *nleF* are located in OI-71 (Bugarel *et al.*, 2011), but are not always found together in our strains. *cif* has been found in earlier studies to be located in prophage genomes with various other effectors (Loukiadis *et al.*, 2008), but we found it alone on many occasions. In contrast, we found a high coincidence between *nleB2* (located in OI-122) and the LEE-encoded effector genes (*map*, *espF* and *espG*), in accordance to the relationship recently reported between *nleB* and virulent EHEC and EPEC strains containing LEE (Bugarel *et al.*, 2011). Other examples of genes that have been reported to occur together are *nleF/nleH1* and *nleC/nleB2* (Coombes *et al.*, 2008; Creuzburg *et al.*, 2011). Our



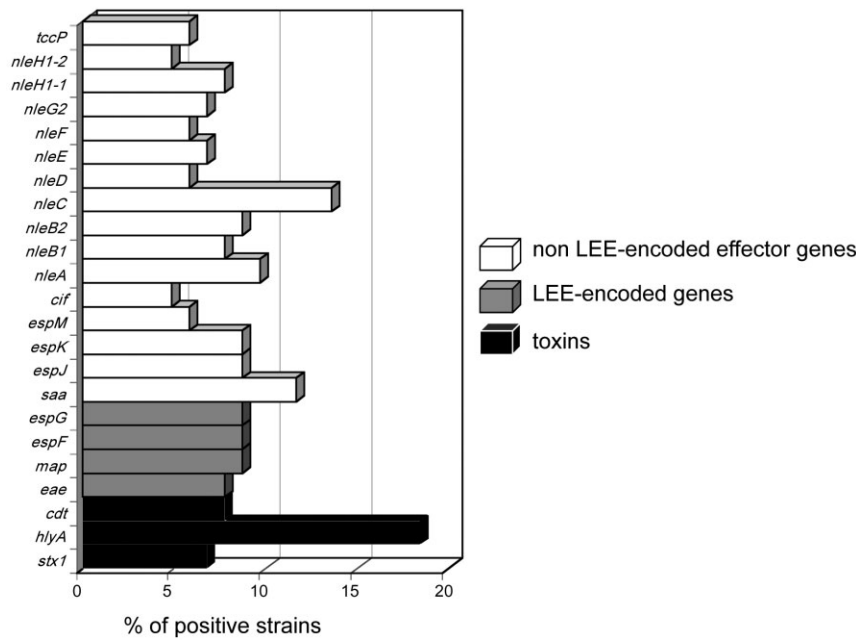
Table 2. Analysed genes detected in those strains showing three or more virulence genes.

Strain	Wastewater origin	Serotype	No. of genes	stx <sub>2</sub>	Genes
51	Cattle	O157:H-	19	stx <sub>2c</sub>	stx <sub>1</sub> , eae, map, espG, espF, espJ, espK, espM, nleA, nleB, nleB2, nleC, nleD, nleE, nleF, nleG2, nleH1-1, nleH1-2, tccP
119	Cattle	O157:H7	19	stx <sub>2c</sub>	eae, hlyA, map, espG, espF, espJ, espK, espM, nleA, nleB, nleB2, nleC, nleD, nleE, nleF, nleG2, nleH1-1, nleH1-2, tccP
121	Cattle	O157:H7	19	stx <sub>2c</sub>	eae, hlyA, map, espG, espF, espJ, espK, espM, nleA, nleB, nleB2, nleC, nleD, nleE, nleF, nleG2, nleH1-1, nleH1-2, tccP
36	Cattle	O157:H-	18	stx <sub>2c</sub>	eae, map, espG, espF, espJ, espK, espM, nleA, nleB, nleB2, nleC, nleD, nleE, nleF, nleG2, nleH1-1, nleH1-2, tccP
84	Cattle	O157:H7	17	stx <sub>2</sub>	eae, hlyA, map, espG, espF, espJ, espK, espM, nleA, nleB, nleB2, nleC, nleD, nleE, nleF, nleG2, nleH1-1, nleH1-2, tccP
124	Human	O157:H-	16	stx <sub>2</sub> , stx <sub>2c</sub>	eae, hlyA, map, espG, espF, espJ, espK, espM, nleB2, nleC, nleD, nleE, nleF, nleG2, nleH1-1, tccP
52	Cattle	O156:H8	10	stx <sub>2c</sub>	map, espF, espG, espJ, espK, cif, nleB, nleE, nleF, nleG2, nleH1-1
133	Human	O15:H-	9	stx <sub>2f</sub>	eae, cdt, map, espF, espG, nleA, nleB2, nleC, nleH1-1
72	Cattle	O28:H28	7	stx <sub>2</sub>	eae, hlyA, map, espG, espF, nleA, nleB2
128	Human	O157:H7	4	stx <sub>2c</sub>	hlyA, saa, cdt, espK
129	Human	O91:H21	4	stx <sub>2</sub> , stx <sub>2c</sub>	hlyA, saa, cdt, espK
98	Mixed	O2:H25	3	stx <sub>2a</sub>	espG, cif, nleA
135	Human	O1:H20	3	stx <sub>2</sub>	hlyA, saa, nleC

results confirm that these gene combinations are more commonly observed than others, but there were also isolates in our collection where the genes were not found together, indicating that the isolates can probably incorporate or lose each gene independently.

In contrast, the genes *stx*<sub>1</sub>, *cdt*, *hlyA*, *saa* and *cif* were rarely found in combination with others (Fig. 3A) and cluster separately. Our results suggest that these strains acquired *stx* by transduction of an Stx phage, independent of other virulence characters. As *stx*, *cdt* has also been found independently of the other genes. This is in accordance to some reports suggesting that *cdt* could be a determinant of virulence when other virulence genes are lacking (Friedrich *et al.*, 2006). Some *cdt* variants are also encoded within the genome of bacteriophages (Asakura *et al.*, 2007; Allué-Guardia *et al.*, 2011) and thus, its acquisition could be independent from that of the other effectors. Asakura *et al.* (2007) reported that the genome of the bacteriophage CDT-1 includes *cdt* in addition to a truncated *cif* and *nleH*. However, we did not find these genes in combination in any of our isolates, implying that the incorporation of all three genes into the same phage genome could be a consequence of recombination events and not a common fact. In addition, the gene *saa*, a plasmid-encoded determinant causing adhesion in strains where the LEE is not present was never found with the four LEE-encoded genes studied. Furthermore, it was not simultaneously present with many other virulence genes, except *hlyA*, suggesting that it also moves independently from the other genes, as it might be the case for *cdt*. *hlyA* also clusters separately from the other effectors because although it can be found with other genes, its occurrence seems to be independent from the other determinants, which is consistent with the fact that it is encoded in plasmid pO157 (Schmidt *et al.*, 1995) and has greater options of transmission. Nevertheless, not all pO157 plasmids contain *hlyA* and in addition this plasmid carries also other virulence determinants that could be the subject of future studies.

Assuming that some of these genes can be mobilized by phages, it is likely that they can be frequently transferred together if they are located together within the same phage. Nevertheless, the reported mosaicism in the genome of bacteriophages (Casjens and Thuman-Commike, 2011) could explain the differential occurrence of the genes, since some of the phages, including those of the same family, could have lost or integrated different genes into their genomes. Indeed, the prevalence of virulence genes reported in different strains do not follow the phylogenetic relationships of the strains (Ogura *et al.*, 2009), suggesting that independent acquisition through mobile genetic elements (phages, PAIs or insertion elements, for instance) that have incorporated new



**Fig. 2.** Frequency (%) of the virulence genes in the positive isolates from wastewater. One-way analysis of variance (ANOVA) tests were used to evaluate the differences between the virulence genes and evaluations were based on a 5% significance level ( $P = 0.05$ ).

virulence genes could have caused the divergence of each strain.

It has been shown that EHEC O157:H7 has evolved stepwise from an atypical EPEC O55:H7 ancestor strain by acquisition of virulent genes (Bugarel *et al.*, 2011). Our results suggest that there is a reservoir of virulence genes in the *E. coli* population that can be mobilized and that between non-pathogenic strains and pathogenic strains, intermediary stages can be found. Indeed, in addition to the Shiga toxin, many virulence genes are mobilized by genetic elements, such as *cif* (encoded in phages) (Loukiadis *et al.*, 2008), *saa* or *hlyA* (encoded in plasmids) (Schmidt *et al.*, 1995) and many genes encoding effector proteins (Tobe *et al.*, 2006; Asakura *et al.*, 2007; Kreuzburg *et al.*, 2011). Some publications have also suggested that even the pathogenicity island LEE can be partially or completely mobilized (Tauschek *et al.*, 2002; Muniesa *et al.*, 2006).

The water environment is a complex ecosystem where *E. coli* from many different origins occur. Within the *E. coli* population, virulence genes remain as a pool from where they can be mobilized. Faecal-contaminated waters can contain STEC (García-Aljaro *et al.*, 2004) as well as phages that carry the *stx*<sub>2</sub> gene (Muniesa and Jofre, 1998;

Imamovic *et al.*, 2010). In this study, we found that the set of STEC strains isolated from wastewater carried many virulence determinants, but that the percentage of strains carrying them was much lower in comparison with isolates directly involved in diseases. In their previous study, Kreuzburg *et al.* (2011) analysed the presence of many effector genes in a collection of *E. coli* strains, including many isolates associated with disease. The percentage of *E. coli* strains without type III effector genes was only 22.8%, which was lower than that observed in our study (53% of isolates without virulence genes), especially considering that the *E. coli* isolates from our collection already harboured *stx*<sub>2</sub>. The presence of effector genes in the study of Kreuzburg *et al.* (2011) was higher in most strains (with the percentage of positive strains from 10% to 90% and with an average of 60% to 70% gene prevalence). In contrast, the average presence of virulence genes was less than 10% of isolates in our set of STEC. In accordance with our results, a low prevalence of *eae*, *nleA*, *cif* and *cdt* has also been reported in STEC isolated from food (Slanec *et al.*, 2009). When looking at the isolates in our study, it appears that we are observing intermediary stages in the evolution of the strains during their acquisition or loss of virulence genes.

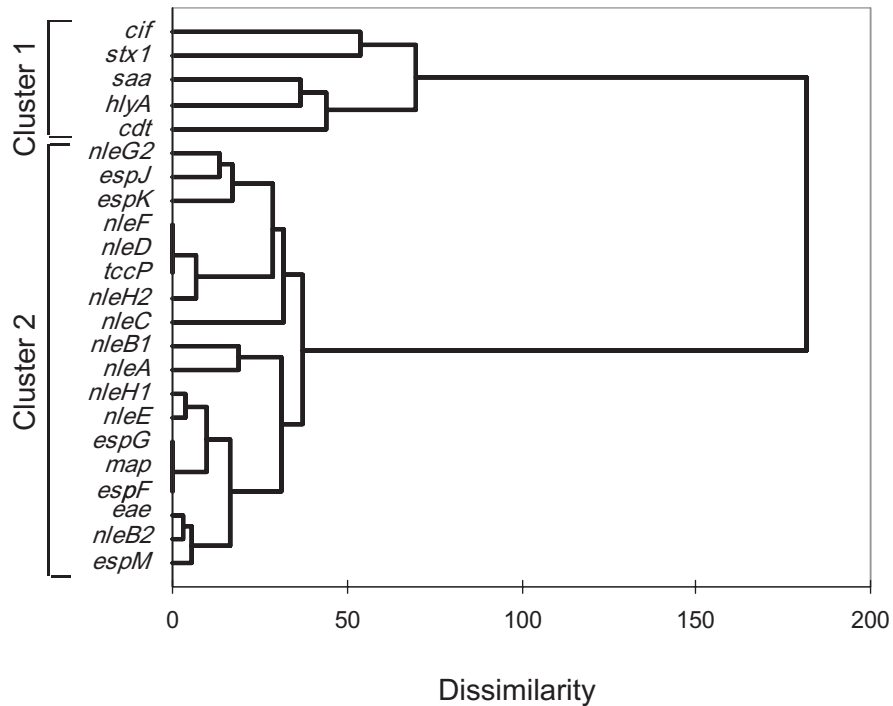
**Fig. 3.** A. Simultaneous occurrence of each virulence gene with the others. The matrix shows the number of isolates in which both genes have been found. Each cell is shadowed to highlight the amount of isolates, from black (which corresponds to nine or eight isolates) to white (which indicates one or no isolate). The left column indicate the number of isolates where each gene was found.

B. Hierarchical clustering of the virulence genes that was constructed based on the occurrence of each gene in the positive isolates. Agglomerative hierarchical clustering was conducted with the software XLSTAT 2011.1. Clustering was done with the Ward's method and results are presented as the dissimilarities calculated by the Euclidean distance assigning a value of '0' to the negative result of each gene and '1' to the positive result.

A

		<i>stx1</i>	<i>hlyA</i>	<i>cdt</i>	<i>eae</i>	<i>map</i>	<i>espF</i>	<i>espG</i>	<i>saa</i>	<i>espJ</i>	<i>espK</i>	<i>espM</i>	<i>cif</i>	<i>nleA</i>	<i>nleB1</i>	<i>nleB2</i>	<i>nleC</i>	<i>nleD</i>	<i>nleE</i>	<i>nleF</i>	<i>nleG2</i>	<i>nleH1-1</i>	<i>nleH1-2</i>	<i>tccP</i>	
7	<i>stx1</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
19	<i>hlyA</i>	5	5	5	5	5	5	9	4	5	4	0	4	3	6	5	4	4	4	4	3	4	3	4	
8	<i>cdt</i>	1	1	1	1	1	1	2	0	2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	<i>eae</i>	8	8	8	8	8	8	0	6	5	6	0	7	5	8	7	6	6	6	6	5	7	5	6	
9	<i>map</i>	9	9	9	9	9	9	0	7	6	6	1	7	6	8	7	6	6	6	6	5	7	5	6	
9	<i>espF</i>	9	9	9	9	9	9	0	7	6	6	1	7	6	8	7	6	6	6	6	5	7	5	6	
9	<i>espG</i>	9	9	9	9	9	9	0	7	6	6	1	7	6	8	7	6	6	6	6	5	7	5	6	
12	<i>saa</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	<i>espJ</i>	6	6	1	5	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6	7	6	6	6	7	5	6	6	
9	<i>espK</i>	5	1	4	5	5	5	5	6	5	6	5	6	6	4	5	6	5	6	6	6	4	5	6	
6	<i>espM</i>	0	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	5	6	5	6	6	
5	<i>cif</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	
10	<i>nleA</i>	6	7	6	5	5	5	5	4	6	5	5	6	5	5	6	5	5	6	5	6	5	5	6	
8	<i>nleB1</i>	5	5	5	6	5	5	5	6	5	5	6	5	5	6	5	5	6	5	6	5	5	6	5	
9	<i>nleB2</i>	7	6	6	6	6	6	5	7	5	6	5	6	5	6	5	6	6	6	6	5	7	5	6	
14	<i>nleC</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	5	6	
6	<i>nleD</i>	6	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6
7	<i>nleE</i>	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5
6	<i>nleF</i>	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6
7	<i>nleG2</i>	6	4	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6
8	<i>nleH1-1</i>	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6
6	<i>nleH1-2</i>	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6
6	<i>tccP</i>	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6

B





## Acknowledgements

We thank Andreu García Vilanova for excellent technical assistance. This study was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2009-07576), the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB), grant 01KI 07128 (Food-Borne Zoonotic Infections of Humans) from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF), grants REIPI RD06/0008/1018 and PS09/01273 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria), grants 09TAL007261PR and 2007/000044-0 (Xunta de Galicia and the European Regional Development Fund, ERDF). Alexandre Martínez-Castillo has a grant FPI from the Ministry of Education and Science. Anna Allué-Guardia has a grant FI from the Generalitat de Catalunya, Catalonia, Spain.

## References

- Allué-Guardia, A., García-Aljaro, C., and Muniesa, M. (2011) Bacteriophage-encoding cytolethal distending toxin type V gene induced from nonclinical *Escherichia coli* isolates. *Infect Immun* **79**: 3262–3272.
- Anonymous (2010) Butlletí Epidemiològic de Catalunya. Brots epidèmics declarats a Catalunya l'any 2008. *Generalitat de Catalunya Departament de Salut* **7**: 15–30.
- Asakura, M., Hinenoya, A., Alam, M.S., Shima, K., Zahid, S.H., Shi, L., et al. (2007) An inducible lambdaoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 14483–14488.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H.A., and Whittam, T.S. (1997) Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2175–2180.
- Blanch, A.R., García-Aljaro, C., Muniesa, M., and Jofre, J. (2003) Detection, enumeration and isolation of strains carrying the *stx*<sub>2</sub> gene from urban sewage. *Water Sci Technol* **47**: 109–116.
- Bugarel, M., Martin, A., Fach, P., and Beutin, L. (2011) Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiol* **11**: 142.
- Casjens, S.R., and Thuman-Commike, P.A. (2011) Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly. *Virology* **411**: 393–415.
- Coombes, B.K., Wickham, M.E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B.B., and Karmali, M.A. (2008) Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2153–2160.
- Creuzburg, K., Middendorf, B., Mellmann, A., Martaler, T., Holz, C., Fruth, A., et al. (2011) Evolutionary analysis and distribution of type III effector genes in pathogenic *Escherichia coli* from human, animal and food sources. *Environ Microbiol* **13**: 439–452.
- Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., and Karch, H. (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**: 74–84.
- Friedrich, A.W., Lu, S., Bielaszewska, M., Prager, R., Bruns, P., Xu, J.G., et al. (2006) Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J Clin Microbiol* **44**: 1844–1846.
- García-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J., and Blanch, A.R. (2004) Prevalence of the *stx*<sub>2</sub> gene in coliform populations from aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3535–3540.
- García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J., and Blanch, A.R. (2005) Characterization of shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol Lett* **246**: 55–65.
- Herold, S., Karch, K., and Schmidt, H. (2004) Shiga-toxin-converting bacteriophages-genomes in motion. *Int J Med Microbiol* **294**: 115–121.
- Imamovic, L., Ballesté, E., Jofre, J., and Muniesa, M. (2010) Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5693–5701.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., and Kaper, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7839–7843.
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., et al. (2003) Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* **41**: 4930–4940.
- Leung, P.H., Peiris, J.S., Ng, W.W., Robins-Browne, R.M., Bettelheim, K.A., and Yam, W.C. (2003) A newly discovered verotoxin variant, VT2 g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7549–7553.
- Loukiadis, E., Nobe, R., Herold, S., Tramuta, C., Ogura, Y., Ooka, T., et al. (2008) Distribution, functional expression, and genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 275–285.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1664–1668.
- Marques, L.R., Pieris, J.S.M., Cryz, S.J., and O'Brien, A.D. (1987) *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol Lett* **44**: 33–38.
- Muniesa, M., and Jofre, J. (1998) Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2443–2448.
- Muniesa, M., Blanco, J.E., De Simon, M., Serra-Moreno, R., Blanch, A.R., and Jofre, J. (2004) Diversity of *stx*<sub>2</sub>-converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-

- producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* **150**: 2959–2971.
- Muniesa, M., Schembri, M.A., Hauf, N., and Chakraborty, T. (2006) Active genetic elements present in the locus of enterocyte effacement in *Escherichia coli* O26 and their role in mobility. *Infect Immun* **74**: 4190–4199.
- Nakao, H., and Takeda, T. (2000) *Escherichia coli* Shiga toxin. *J Nat Toxins* **9**: 299–313.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998) Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142–201.
- Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., *et al.* (2009) Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 17939–17944.
- Park, C.H., Kim, H.J., Hixon, D.L., and Bubert, A. (2003) Evaluation of the duopath verotoxin test for detection of shiga toxins in cultures of human stools. *J Clin Microbiol* **41**: 2650–2653.
- Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., and Paton, J.C. (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **69**: 6999–7009.
- Prager, R., Fruth, A., Busch, U., and Tietze, E. (2010) Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2 g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *Int J Med Microbiol* **301**: 181–191.
- Schmidt, H., Beutin, L., and Karch, H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *E. coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**: 1055–1061.
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., and Karch, H. (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1205–1208.
- Slanec, T., Fruth, A., Creuzburg, K., and Schmidt, H. (2009) Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6187–6197.
- Tauschek, M., Strugnell, R.A., and Robins-Browne, R.M. (2002) Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity island of rabbit-specific strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 1533–1550.
- Tobe, T., Beatson, S.A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C.M., Fivian, A., *et al.* (2006) An extensive repertoire of type III secretion effectors in *E. coli* O157 and the role of lambdaoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 14941–14946.
- Tree, J.J., Wolfson, E.B., Wang, D., Roe, A.J., and Gally, D.L. (2009) Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **17**: 361–370.
- Wang, G., Clark, C.G., and Rodgers, F.G. (2002) Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **40**: 3613–3619.

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Fig. S1.** Number of virulence genes found in each serotype in the isolates showing positive results for one or more genes. (A) All positive serotypes; (B) positive serotypes distributed by wastewater origin.

**Table S1.** Effector genes analysed in this study.

**Table S2.** Serotypes comprising the environmental collection. Serotyping of O and H antigens of the strains were determined according to the method described by Guinée and colleagues (1981) employing all available O (O1 to O181) and H (H1 to H56) antisera. All antisera were obtained and absorbed with the corresponding cross-reacting antigens to remove non-specific agglutinins.

**Table S3.** Oligonucleotides, target genes, binding sites and product size for detection of all genes analysed in this study. PCRs were performed with a GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain) and using the primers described in Table S3. The conditions for amplification were 1 cycle at 94°C and 5 min for denaturation, followed by 35 cycles at 94°C for 1.5 min, 1 min at the annealing temperature corresponding to each oligonucleotide and elongation at 72°C according to the product size (1 min for each 1000 bp). Finally, 1 cycle at 72°C for 4 min ended the amplification procedure. The PCR products were analysed by gel electrophoresis on a 1% agarose gel and bands were visualized by ethidium bromide staining. For sequencing the same primers were used.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.



### **4.3 CAPITULO 3:**

**Movilización de *saa* en *E. coli* productoras de la  
toxina Shiga**



## Movilización de *saa* en *E. coli* productoras de la toxina Shiga

Alexandre Martínez-Castillo y Maite Muniesa.

### Introducción

Las bacterias *E. coli* productoras de la toxina Shiga (STEC) son las causantes de graves brotes en el mundo (Kaper *et al.*, 2004), siendo el serotipo O157:H7 el que produce un número más elevado de Síndrome urémico hemolítico (SUH). La característica de esta *E. coli* es que codifican para el gen *stx*, causante del SUH, y que se encuentra codificado en un bacteriófago atemperado (O'Brien *et al.*, 1984; Newland *et al.*, 1985). La transducción de *stx* es un mecanismo por el cual surgen nuevas cepas virulentas como por ejemplo la cepa O104:H4, causante del brote en Alemania en Mayo del 2011 (Laing *et al.*, 2012).

Las cepas STEC tiene la capacidad de adherirse íntimamente a las células epiteliales, mediante un proceso denominado "attachment and effacement" (A/E) (Jerse *et al.*, 1990). La adhesión está mediada por una intimina codificada por el gen *eae*, que se encuentra dentro de la isla de patogenicidad LEE (por *locus of enterocyte effacement*). En LEE se encuentran codificadas además otras proteínas necesarias para producir el fenómeno de A/E (McDaniel *et al.*, 1995).

Sin embargo, no todas las STEC tienen LEE, aunque son capaces de producir SUH o infecciones más suaves en humanos (Doughty *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2009). Para producir la adhesión estas cepas deben reemplazar el gen de la intimina por otros factores. Este es el caso de otra adhesina designada como adhesina autoaglutinante de STEC (*Saa*) (Paton and Paton, 1998, 2002; Paton *et al.*, 2001). *saa* realiza la función de *eae* cuando las cepas son LEE negativas, por lo tanto nunca se encuentran *saa* y *eae* simultáneamente en la misma cepa. *saa* se ha propuesto incluso como marcador para cepas STEC LEE negativas (Paton and Paton, 2002). Se ha descrito que *saa* se encuentra en un plásmido designado

pO113 (Srimanote *et al.*, 2002) y se ha reportado que el plásmido pO113 se auto-moviliza a bajas frecuencias (Leyton *et al.*, 2003).

Estudios anteriores han indicado que ciertos genes de virulencia se encuentran distribuidos independientemente frente a otros en STEC (Martínez-Castillo *et al.*, 2012). Formando un grupo de genes como *cdt*, *cif* o *saa* que raramente se encuentran con otros genes, sugiriendo que se movilizan de manera horizontal. *cdt* y *cif* han sido descrito en bacteriófagos (Asakura *et al.*, 2007; Loukiadis *et al.*, 2008; Allué-Guardia *et al.*, 2011).

### **Objetivos y metodología**

EL objetivo de este estudio es investigar la posible movilización de *saa* mediada por un bacteriófago.

Para llevar a cabo el estudio se partió de una colección de 103 cepas STEC, de las cuales se hallaron 12 cepas que codifican para *saa*. Fueron realizados estudios de caracterización fenotípica de sus distintas variantes. Ninguna de estas cepas presentaba el plásmido pO103, sin embargo se observó la presencia de *saa* en la fracción de ADN fágico de las muestras y se cuantifico los niveles de inducción de *saa* por PCR cuantitativa.

Además se aisló la partícula proteica en la que se detecta el gen *saa* y se observó por microscopia electrónica y caracterizó mediante proteómica. Por último, se quiso comprobar si se detectaba *saa* en la fracción vírica en muestras con diferente procedencia animal.

### **Resultados**

Las cepas con *saa* presentan repeticiones de 111 bp en el gen, lo que hace que se encuentren hasta 6 variantes dependiendo del número de repeticiones. En nuestras cepas analizadas se detectaron 4 variantes diferentes, la variante cinco fue la única no detectada.

Se cuantificó la capacidad que poseían de adherirse a células Hep2 y no se observó diferencia entre las 4 variantes, presentando unos valores alrededor del 60% de adherencia.

Una vez caracterizadas fenotípicamente las cepas *saa* positivas se observó si podrían movilizarse mediante un bacteriófago. Para ello se realizó un test de la gota sobre la bacteria *E. coli* WG5 con la suspensión fágica de tres cepas *saa* positivas. La membrana de nylon fue hibridada frente a una sonda específica de *saa* marcada con DIG. El resultado fueron halos de lisis positivos, que indicaban que *saa* podría movilizarse sobre una fago y que además parece ser que podría ser infectivo.

Se desarrollaron ensayos de inducción con mitomicina C (inductor clásico de bacteriófagos) y en ausencia de ella, y se cuantifico por qPCR. Se observó que las cepas sin inducir producen una inducción espontanea de *saa*, alrededor de 4 unidades logarítmicas de CG/ml, sin embargo al inducir con mitomicina C se detecta una inducción en ciertas cepas que llega hasta 6 unidades logarítmicas de CG/ml.

Todas las cepas que son *saa* positivas los son también para *stx*, por ello se realizó una titulación y se transfirió la placa conteniendo calvas de lisis sobre una membrana de nylon que se hibrido a la vez con una sonda específica para *saa* y otra para específica para *stx* marcadas con DIG. Se observó que ambas sondas hibridaban sobre las mismas calvas.

Para poder determinar la morfología de las partículas fágicas portadoras de *saa* se realizó una observación por microscopia electrónica. Para ello, primero se purificaron las suspensiones fágicas mediante gradientes de CsCl. Se observaron dos bandas de CsCl, una que correspondía a la densidad de 1.4g/ml y otra a la de 1.5g/ml. En la banda de mayor densidad se observaron partículas fágicas tipo *Siphoviridae* con un tamaño de cápside de 40x100 nm y una cola no contráctil entre 180-200nm y en esta banda sólo se detectó *stx*. En la otra banda de menor densidad se detectaron partículas con morfología tipo *Podoviridae* con una cápside de 50nm y una cola corta en ella se detectaba tanto *stx* como *saa*.

La fracción protéica contenida de las partículas de la banda de CsCl en la que se detectó *saa* se purificó y se observó por electroforesis SDS-PAGE. Dos de las bandas



mayoritarias fueron analizadas por cromatografía de masas y se observó que correspondían a dos proteínas principalmente: P1 y P2. P1 está formado por dos proteínas principales U5P439 Y M1FPN2. U5P439 es homóloga a proteínas de partículas fágicas descritas en *Shigella* no caracterizadas y M1FPN2 se ha descrito como parte de la cápside proteica de fagos. Además la familia de la proteína M1FPN2 presenta homología con proteínas tipo “gene transfer agent” (GTA). P2 está formada también por proteínas fágicas.

Por último, se cuantificó la presencia de *saa* en partículas fágicas presentes en el medio ambiente. Se analizaron 122 muestras de aguas que contenían contaminación fecal de diferentes orígenes. Las muestras de agua residual (humana) presentaron unos 39% de positivos, seguidas por un 41% en las muestras de vaca y un 48% en muestras de cerdo y ave. En las muestras positivas de los diferentes orígenes se cuantificó un promedio similar de CG ( $10^3$  CG/ml).

## Discusión

Las cepas STEC que son LEE negativas necesitan mecanismos de adhesión diferentes para poder llevar a cabo la infección. Las cepas LEE negativas se ha descrito que codifican para una adhesina denominada Saa (adhesina autoaglutinante de STEC) que lleva a cabo a la adhesión, codificada dentro de un megaplásmido pO113.

En las muestras STEC *saa*-positivas ambientales estudiadas no se detectó la presencia del megaplásmido pO113. Sin embargo todas contenían *saa* que producía adhesión a células epiteliales (Lucchesi *et al.*, 2006).

Tras la inducción con mitomicina C, se observaron partículas de morfología tipo *Podoviridae* con la presencia de *stx* y *saa* en altas densidades. Teniendo en cuenta que se detectaban a la vez ambos genes en las placas de lisis generadas sobre *E. coli* WG5, los resultados sugieren que *saa* podría empaquetarse por un mecanismo de transducción generalizada o un mecanismo similar a los descritos en los GTA.

La espectrofotometría de masas reveló que estas partículas contenían proteínas de cápside fágica lo que confirmaría un origen fágico y además estas partículas presentaron homología con proteínas tipo GTA. Los GTA son un tipo de elementos derivados de fagos con la capacidad de empaquetar partes del genoma aleatoriamente y han sido descritos en alfaproteobacterias aisladas en océanos (Lang y Beatty, 2007; McDaniel *et al.*, 2010, 2012). Debido a las metodologías usadas en la detección de fagos o partículas derivadas de fagos es difícil diferencia entre fago y GTA (Brown-Jaque *et al.*, 2015). Su presencia aún no sido descrita en Enterobacterias, pero estudios previos (Asadulghani *et al.*, 2009) han demostrado que *E. coli* O157:H7 posee profagos que podrían ser el origen de este tipo de partículas fágicas.

La presencia de *saa* en la fracción de ADN vírico de las muestras ambientales corrobora la hipótesis de la movilización de *saa* mediante partículas fágicas. Además el hecho que presente unos valores similares de GC en las diferentes muestras podría indicar la presencia de un mecanismo tipo GTA producido con similar frecuencia a partir de diferentes cepas.

En conclusión, en el trabajo estudiado presenta la movilización del gen de virulencia *saa*, previamente descrito en un plásmido, mediante una partícula fágica probablemente tipo GTA. Este fenómeno probablemente no es específico de *saa*, sino que podría ser una estrategia de STEC para poder diseminar su material genómico en el medio ambiente.



# **Mobilization of *saa*, encoding an STEC autoagglutinating adhesin, in Shiga toxin producing *Escherichia coli***

**Alexandre Martínez-Castillo, Maite Muniesa\***

Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, 08028  
Barcelona, Spain

**Running title:** *saa* mobilization in STEC

**Key words:** bacteriophage, adhesion, STEC, LEE, *saa*, *Escherichia coli*

**\*Corresponding author**

Maite Muniesa

Tel.: +34 93 4039386

Fax: +34 93 4039047

E-mail: mmuniesa@ub.edu

## ABSTRACT

Pathogenic Shiga toxin producing strains (STEC) harbor several inducible and non-inducible prophages. Many virulence genes in *E. coli* are encoded in these temperate phages, being Shiga toxin phages the clearest example. In previous studies of environmental STEC strains, we identified some virulence genes occurring independently of other genes, suggesting horizontal transmission. Among these, all were described in plasmid or phages. This study focuses in one of these factors, the STEC autoagglutinating adhesin encoded by *saa* that is present in LEE-negative STEC strains and provides adhesion functions. *saa* was described encoded in a megaplasmid, but no evidences of the plasmid were found in the environmental strains of this study. We therefore explored *saa* mobilization by other mechanisms, as phages.

*saa*-positive cultures were treated with inducing agents that caused an increase of *saa* copies in the viral fraction of the cultures. The supernatants were then purified by CsCl density gradients, where two bands were obtained. A lower band contained only Stx phages. An upper band contained *stx* but also high number of *saa* copies. The particles in the upper band were hexagonal viral capsids. These were infectious and showed positive hybridization for *saa* but also for *stx* by plaque blot. *Saa* was detected in phage DNA, although no phage DNA sequences were identified up-or-downstream *saa*. Analyses of the proteins of *saa*-particles in the upper CsCl band were identified as phage capsid proteins and homologies were found with capsid proteins of gene transfer agents (GTAs). Despite the evidences showing the phage origin of the particles, stable transduction of *saa*-particles was not achieved.

Our results indicate that *saa* is mobilized by phage-derived particles. We believe this might be a more general mechanism, not limited to *saa*, in which by mobilizing virulence genes using phage derived particles, STEC guarantees the spread of its genetic legacy.

## INTRODUCTION

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an important emerging pathogen causing severe outbreaks worldwide (Kaper *et al.*, 2004). These strains belong to various serotypes and, although *E. coli* O157:H7 is the most prevalent serotype associated with HUS, there is a growing concern over the emergence of highly virulent non-O157 STEC serotypes that are globally distributed (Bettelheim, 2007). The STEC strains express diverse variants of Shiga toxin. The *stx* operon is located in the genome of temperate bacteriophages (Stx phages) that are inserted as prophages in the bacterial chromosome (Newland *et al.*, 1985; O'Brien *et al.*, 1984). Shiga toxin phages are recognized elements for horizontal *stx* transfer and acquisition by means of phage transduction. Beside Stx phages, phage transduction is a demonstrated mechanism for the emergence of new virulent strains, including unfortunate recent examples, as strain O104:H4, the causative agent of the outbreak in Germany in May 2011 (Laing *et al.*, 2012). The *E. coli* genome is very dynamic and several prophages, inducible or not, have been identified (Asadulghani *et al.*, 2009; Brüßow *et al.*, 2004). Pathogenic strains, such as O157:H7, contain a higher number of temperate phages than the non-pathogenic ones (Ogura *et al.*, 2009).

A subset of STEC referred to as the enterohemorrhagic *E. coli* have the capacity to intimately attach to and efface intestinal epithelial cells, a pathology called the A/E lesion affecting the intestinal mucosa (Jerse *et al.*, 1990). The A/E lesion is mediated by the adhesin intimin

(encoded by *eae*) (Jerse *et al.*, 1990), by its bacterially encoded receptor, Tir, and by effectors secreted through a type III secretion system (Kaper *et al.*, 2004). The proteins needed for the A/E lesion are all encoded within a large pathogenicity island called the locus of enterocyte effacement (LEE) (McDaniel *et al.*, 1995)

The most typical and virulent pathogenic *E. coli* group belongs to the top six serotypes ((O26, O45, O103, O111, O121 and O145) in addition to O157:H7 )(USDA-FSIS, 2011) , produce Shiga toxin and harbors LEE with the A/E ability. However, because not all STEC are O157 or not all harbor LEE, this subset of non-O157 and LEE-negative strains should not be underestimated. The lack of one of the generally accepted virulence factors is not a clear evidence of the lack of pathogenicity, since some strains lacking LEE are able to cause sporadic cases of HUS and milder infections in humans (Doughty *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2009). Some STEC serotypes replace the function of the intimin by producing other factors. This is the case of another adhesin designated as the STEC autoagglutinating adhesin (Saa) (Paton & Paton, 2002, 1998; Paton *et al.*, 2001). *saa* is never found in the presence of *eae*, suggesting that Saa expression is a mechanism that supplies the adhesion function when *eae* is absent (Paton *et al.*, 2001). Therefore, *saa* has been proposed as a marker for a subgroup of LEE-negative STEC strains, some of which are capable of causing severe gastrointestinal or systemic diseases in humans (Paton & Paton, 2002). *saa* has been described to be encoded in a large plasmid, designated pO113 (Srimanote *et al.*, 2002), either in serotype O113 (particularly in O113:H21) or in non-O113 *E. coli* serotypes (Jenkins *et al.*, 2003; Prager *et al.*, 2005). Moreover, pO113 was reported to be self-transmissible at low frequencies (Leyton *et al.*, 2003)

Recent reports from our group indicated that certain virulence characters are found in STEC strains independently of others (Martínez-Castillo *et al.*, 2012) . For example, the genes of cytolethal distending toxin (*cdt*), the effector gene *cif* or *saa*, were rarely found in combination with other virulence genes. These results suggested that the strains acquired these genes in an independent way during their evolution, plausibly by horizontal gene transfer. Since *cdt* and *cif* have been reported to be encoded in inducible bacteriophages (Allué-Guardia *et al.*, 2011; Asakura *et al.*, 2007; Loukiadis *et al.*, 2008), in this study we investigated the potential phage-mediated mobilization of *saa*.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Isolation of environmental Shiga toxin-producing *E. coli* strains.-** A collection of 103 *stx*<sub>2</sub>-positive *E. coli* (STEC) strains were isolated as previously described (Blanch *et al.*, 2003; Martínez-Castillo *et al.*, 2012) in Catalonia (north-east of Spain) from raw sewage samples of urban origin (mostly contaminated by human fecal wastes) and from wastewater samples from three different abattoirs (cattle, pig, and a slaughterhouse processing cattle, lamb and goat ). All samples were evaluated for the presence of *saa* as described below. The strains were isolated during a six-year period (2003 to 2011) only on the basis of *stx*<sub>2</sub> presence. Serotyping of O and H antigens of the strains were determined according to the method described by Guinée *et al.* (1981) employing all available O (O1 to O181) and H (H1 to H56) antisera. All antisera were obtained and absorbed with the corresponding cross-reacting antigens to remove non-specific agglutinins.

**Media and growth conditions.** Bacteria were grown in LB (Luria-Bertani) broth or LB agar at 37°C. SOB (Super Optimal broth) and SOC (Salt-Optimized Carbon broth) media were used to



prepare electrocompetent cells and for bacteria cells recovery after transformation, as described below. When necessary, ampicillin (100 µg/ml) was added to the media.

**Conventional PCR procedures.**- PCR reactions were performed using a GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain). For PCR amplification, one-µl of chromosomal or phage DNA, diluted 1:20 (v:v), was used. Primers used are described in Table 1.

**Table 1.** Oligonucleotides used in this study.

Oligonucleotide	Sequence ( 5'-3')	Target gene	Size (bp)	Reference
saa-r	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	saa	119	Paton and Paton, 2002
saa-f	CGTGATGAACAGGCTATTGC			
up378	GCGTTTTGACCATCTTCGT	stx <sub>2</sub> -a fragment	378	Muniesa <i>et al.</i> , 2004
Lp378	ACAGGAGCAGTTTCAGACAG			
Stx1-a	TCTCAGTGGGCGTTCTTATG	stx <sub>1</sub>	338	Wang <i>et al.</i> , 2002
Stx1-b	TACCCCTCAACTGCTAATA			
HlyA-a	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG	EHEC <i>hlyA</i>	569	Wang <i>et al.</i> , 2002
HlyA-b	TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC			
nleB2-V-for	AAGGAATATGAGTTAAAGGTC	<i>nleB2-1</i>	216	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
nleB2-V-rev2	AGCAGTCTTTGGTTGACTG			
espK-V-for2	GTAGCGGACACTCTCTGG	<i>espK</i>	385	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
espK-V-rev	GACATTCTGCTCCTATTCCG			
nleC-V-for	ACAGTCCAACCTCAACTTTTCC	<i>nleC</i>	239	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
nleC-V-rev2	GGCTCAAAGCATCAAGTATAG			
CDT-s1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	cdt <sup>(a)</sup>	466	Tóth <i>et al.</i> , 2003
CDT-s2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG			
CDT-as1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA			
CDT-as2	AAATCTCTGCAATCATCCAGTTA			

VSAAF	ACTCGCATAATTGGTGGTG	saa variants	111	Luchhesi et al., 2006
VSAAR	ATCATTGGTATTGCTGTCAT			
STX- f	ACGGACAGCAGTTATACCACTCT	qPCR for stx <sub>2</sub>	65	Imamovic et al., 2010
STX- r	ACGTTCCGGAATGCAAATCAG			
STx-probe	FAM-CCAGCGCTGCGACACG-NFQ			
SAA-RT F	CCGGAGAGGATATCAAAGCAAT	qPCR for saa	63	
SAA-RT R	CCTCCGTTTTACCGCTACCA			
SAA- probe	FAM-ACTCGGAGATGTCATATC-NFQ			

(<sup>a</sup>) cdt detection was performed using a multiplex PCR containing the four oligonucleotides

*saa* variants in the samples were characterized by conventional PCR using the primers (Table 1) and conditions previously described (Lucchesi *et al.*, 2006)

**Adherence assays on epithelial cells.-** Adherence assays were performed using the method described by Torres et al. (2002). HEp-2 cells were grown to semi-confluence in 48-well microplates at 37°C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Before being infected, cells were washed three times with PBS (pH 7.4) and the wells were filled with DMEM supplemented with 1% w/v mannose. Bacterial strains grown in LB broth overnight were diluted to obtain 1×10<sup>7</sup> cells per well and were incubated for 3h at 37°C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Then, the culture medium was removed from the wells and cells were washed three times with PBS to remove non-adherent bacteria, followed by the addition of 200µl of 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS buffer and were further incubated for 30min at room temperature to detach the HEp-2 cells from the wells. Finally, 100µl of this mixture were transferred to 1.5ml tubes with 900µl LB broth and decimal serial dilutions of each culture were plated onto LB agar plates to obtain an indirect count of the adhered bacteria.

For qualitative analysis, we placed a coverslip in the microplate wells for each sample tested and after 3h of incubation the coverslip was washed three times with PBS, fixed with methanol for 10 min and stained with Giemsa for 60 min to visualize adherent bacteria under the light microscope. All the experiments were performed in triplicate and the data represent the results of at least two independent experiments. Results are expressed as the mean $\pm$ SD and statistical significance was determined by a Student's *t*-test.

**Real time qPCR.**- A plasmid construct to generate standards for the qPCR assays was used. The 505 bp fragment of *saa* from strain 35 (Table 2) was cloned into a pGEM-T Easy vector (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). The construct was transformed by electroporation (2.5 kV, 25 F capacitance and 200 V resistance) into *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetent cells. The presence of the insert and its orientation was assessed by conventional PCR and sequencing, using pGEM and *saa* primers (Table 1). The construct was purified using the Qiagen Plasmid Midi purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) and the concentration of the vector was quantified by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE). The number of construct gene copies (GC) in the stock was calculated as previously described (Imamovic et al., 2011). Serial decimal dilutions of this stock were made in double-distilled water to prepare the standard curve for the qPCR assay.

Primers and probes (Table 1) were designed for *saa* qPCR with the software tool Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). *saa* qPCR probe was a minor groove binding (MGB) probe

with a FAM reporter (FAM: 6-carboxyfluorescein) and a non-fluorescent quencher (NFQ). The *saa* probe hybridizes outside the repeat region in *saa*. The specificity of the primers and probes was determined by sequence alignments using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Amplification of a region of 63bp was performed following a standardized TaqMan amplification protocol. A 20- $\mu$ l reaction mixture, performed with the TaqMan Environmental Real-Time PCR Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, Spain), contained 2  $\mu$ l of the DNA sample or quantified plasmid DNA. The qPCR conditions were as follows: an initial setup step of 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 s of denaturation at 95°C, and 1 min of annealing/extension at 60°C. All samples, standards, and positive and negative controls were run in triplicate. The threshold cycle ( $C_t$ ) was defined as the average of the triplicate  $C_t$  values obtained.  $C_t$  data were expressed as the number of GC according to the values obtained with the standard for each qPCR reaction.

**Table 2.** Strains and plasmid used in this study

Strain	Relevant Characteristics	Reference
<i>E. coli</i> 13	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> .31	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> 35	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> 38	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> 53	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> 57	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> 58	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> 82	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> 325	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> 326	STEC wild type	Blanch et al., 2003

<i>E. coli</i> 114	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> 124	STEC wild type	Blanch et al., 2003
<i>E. coli</i> O157:H7 EDL933	STEC wild type	Perna et al., 2001
<i>E. coli</i> WG5	Laboratory strain	ATCC 700078
<i>E. coli</i> C600	Laboratory strain	ATCC 23724

**Induction of temperate bacteriophages and preparation of phage suspensions.** Bacteria were grown from single colonies in LB to the exponential growth phase ( $OD_{600}=0.3$ ). Mitomycin C was added to the cultures to a final concentration of 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . Cultures were then further incubated in the dark for 18 hours at 37°C. Supernatants of the induced cultures were treated with chloroform, centrifuged at  $10000 \times g$  for 10 min and the supernatants were filtered through low protein-binding 0.22- $\mu\text{m}$ -pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA) and treated with DNase (100 units/ml; Sigma-Aldrich, Spain) for 1h at 37°C. DNase was added at a final concentration of 100 U and incubated for 1h at 37°C. DNase was heat inactivated at 80°C for 5 min.

**Phage blot.-**, *E. coli* WG5 was used as a host. A drop of phage suspension, prepared as described above, was spotted onto a monolayer. The monolayer was prepared with 1 ml of host strain grown at an  $O.D_{600}$  of 0.3, and mixed with 2.5 ml of LB soft agar (LB broth with 0.7% agarose) containing 5 % of glycerol (Santos et al., 2009), poured onto LB agar plates and incubated overnight at 37°C. The plaques were transferred to nylon membranes (Hybond N+; Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain).

A 119-bp DNA fragment of *saa* obtained with primers *saa-up/saa-lp* (Table 1) was labelled with digoxigenin by incorporating digoxigenin-11-deoxy-uridine-triphosphate (Roche

Diagnostics, Barcelona, Spain) during PCR amplification (Muniesa *et al.*, 2004) and was used as probe.

Plaque blot hybridization was performed as previously described (García-Aljaro *et al.*, 2005, Sambrook and Rusell, 2001) using nylon membranes (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Spain). Stringent hybridization was achieved with the DIG DNA Detection kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain), according to the manufacturer's instructions.

**Isolation of phage DNA and detection of *saa*.**- Phage DNA was isolated from phage suspensions, obtained as described above. When necessary, an aliquot of the phage suspension at this stage was used as a control in Real-Time PCR to confirm that bacterial or non-encapsidated DNA containing the *stx*<sub>2</sub> had been removed from the sample after DNase treatment. Phage DNA was extracted by proteinase K digestion and by phenol/chloroform (1:1) (*v:v*) treatment. The phenol/chloroform/phage suspension mixture was added to Phase Lock Gel tubes (5- Prime, VWR International, Madrid, Spain) and processed according to the manufacturer's instructions. DNA was precipitated using absolute ethanol and 3 M sodium acetate and collected by centrifugation. Phage DNA was eluted in 30 µl of TE buffer and evaluated by agarose gel (0.8%) electrophoresis. Bands were then visualized by ethidium bromide staining. The concentration and purity of the phage DNA extracted were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA).

**Phage purification by CsCl gradients.**- One hundred-ml portions of the phage suspension were concentrated using 100 kDa Amicon Ultra centrifugal filter units according to the manufacturer's instructions (Millipore, Bedford, MA). Phages were then purified by cesium chloride centrifugation at 80,000xg for 2 hours at 4°C in a SW41Ti rotor (Sambrook & Russell, 2001). The easily visible grey bands corresponding to bacteriophages (Franki et al., 1991; Sambrook & Russell, 2001) were collected and dialyzed to remove the CsCl.

**Electron microscopy.**- A drop of the phage suspension after CsCl purification was adsorbed onto carbon-coated Formvar films and negatively stained with 2% ammonium molybdate (pH 6.8) for 1.5 min. Negatively stained samples were observed in a Jeol 1010 transmission electron microscope (JEOL USA, Inc) operating at 80 kV.

**Protein characterization.**- 20 ml of the CsCl purified phage suspension were run in a 12% polyacrylamide gel at 130V for 50min. The resulting bands were excised and treated with porcine trypsin (Sequence grade modified Trypsin, Promega) for 12h at 37°C. The resulting peptide mixture was extracted from the gel matrix with 10% formic acid (FA) and acetonitrile (CAN), and dried-down with a speed vacuum system. The dried-down peptide mixture from tryptic digestion was then resuspended in 1% FA and analyzed by nanoflow chromatography using a nano-UPLC nanoAcquity system (Waters), coupled to a mass spectrometer LTQ-OrbitrapVelos (Thermo Scientific).

Up to the 10th most abundant peptides (minimum intensity of 500 counts) from each MS scan were selected and then fragmented using CID (collision induced dissociation) in the linear ion trap (LTQ) using helium as collision gas (38% normalized collision energy). Generated raw data were collected with Thermo Xcalibur (v.2.2). Database search was performed by the Sequest search engine using Thermo Proteome Discover (v.1.3.0.339) against Uniprot database. Both target and a decoy database were searched to obtain a false discovery rate (FDR), and thus estimate the number of incorrect peptide-spectrum matches that exceed a given threshold. Results were filtered so only proteins identified with at least 2 high confidence peptides ( $q < 0.01$ ; FDR 1%) were considered.

***saa* in viral fraction of animal and raw urban wastewater.**- Ninety nine samples containing exclusively fecal contaminants of a single animal origin (cattle, swine, or poultry) were collected from slaughterhouse wastewater effluents and no human fecal contamination was expected in these samples. Also in this study, twenty three samples of urban raw sewage from the Barcelona metropolitan area were analyzed. In the areas of study no incidence of enterocolitis caused by STEC was reported during the sampling period (2013–2014). The viral (phage) fraction was extracted from twenty five milliliters of each sample as previously described (Colomer-Lluch *et al.*, 2011), followed by the quantification of 7 $\mu$ l by real-time qPCR.



## RESULTS

In a previous study (Martinez-Castillo et al. 2011), the occurrence of diverse virulence genes in a collection of non-clinical STEC strains was evaluated, showing that those genes occurring independently in the strains, and not associated with other genes, such as *stx*, *hly*, *cdt* or *saa*, were coincident with those described in mobile genetic elements (phages or plasmids). Although *saa* has been described to be located within the pO103 megaplasmid (Srimanote et al., 2002), our analysis of the STEC wild type strains failed to detect the pO103 plasmid in many of the strains evaluated by PCR (Table 2). Since some other mobile genetic elements can be associated to plasmids for the mobilization of genes, and due to the wide distribution of *saa* among STEC, we evaluated the possibility that *saa* could be transferred by other genetic vehicles in addition to the plasmid-mediated transfer already described (Srimanote et al., 2002), according to the absence of pO103 in our *saa* positive strains.

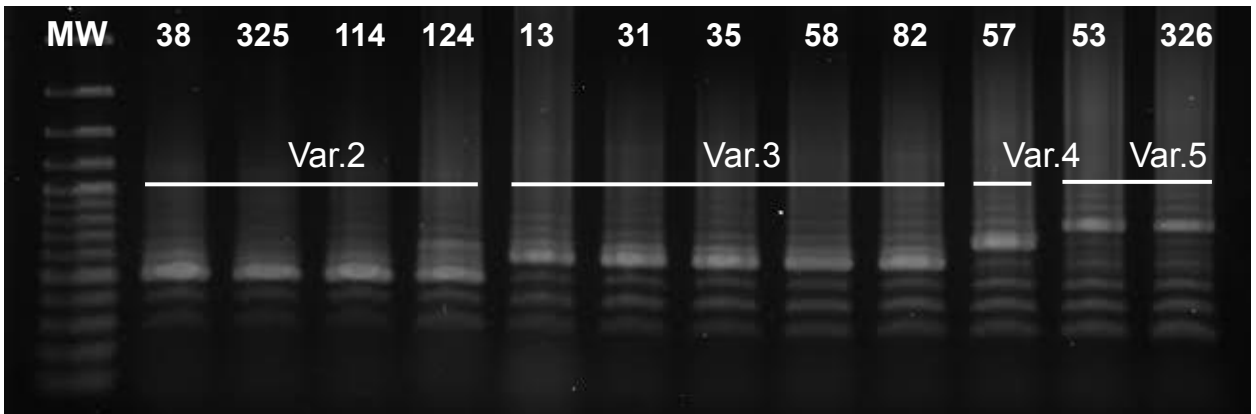
The *saa*-positive strains were analyzed for several virulence genes, particularly those described in phages or other mobile genetic elements (Table 3). All strains were found to lack LEE-associated genes, in accordance with previous reports indicating that *saa* is only present in those strains without LEE PAI and hence without *eae* encoding for intimin. Some strains carried *cdt* or *hly* and none was positive for other genes.

**Table3.** Analyzed genes detected in *saa*-positive strains

Strain	Origin	Serotype	Virulence genes	pO103
13	Cattle	O181:H49	<i>saa, stx<sub>2</sub>, hlyA</i> .	No
31	Cattle	O1:H20	<i>saa, stx<sub>2</sub>, hlyA</i> .	No
35	Cattle	O1:H20	<i>saa, stx<sub>2</sub></i> .	No
38	Cattle	O22:H8	<i>saa, stx<sub>2</sub></i>	No
53	Cattle	O1:H20	<i>saa, stx<sub>2</sub>, nleB2</i>	No
57	Cattle	O76:H2	<i>saa, stx<sub>1</sub>, stx<sub>2</sub></i>	No
58	Cattle	O113:H21	<i>saa, stx<sub>2</sub></i>	No
82	Cattle	O181:H49	<i>saa, stx<sub>2</sub>, hlyA</i>	No
325	Human	O157:H7	<i>saa, stx<sub>2</sub>, hlyA, cdt, espK</i>	No
326	Human	O91:H21	<i>saa, stx<sub>2</sub>, hlyA, cdt, espK</i>	No
114	Human	O22:H8	<i>saa, stx<sub>2</sub>, hlyA</i>	No
124	Human	O1:H20	<i>saa, stx<sub>2</sub>, nleC</i>	No

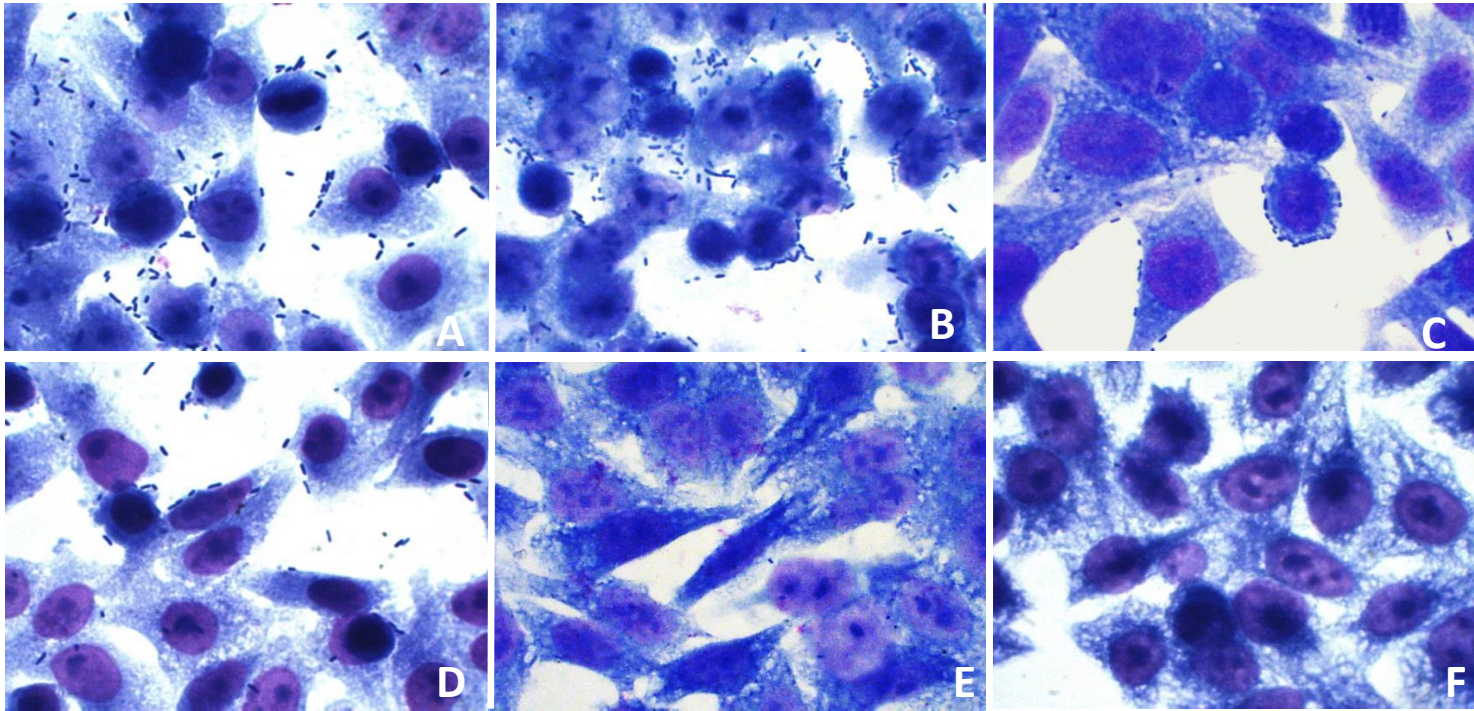
### Characterization of *saa* in the positive strains

The 12 *saa*-positive wild type strains (Table 3), were analyzed for the presence of *saa* variants and the strain ability to express *saa*. *saa* has a multiple repetition of 111 bp and the type of variant is based on the number of repetitions. Variant 1 has the minor number of repetitions with 1 repeat while variant 6 has the highest, with 6 repeats. We were able to detect four different *saa* variants with the exception of variants one and six. Variants two and three were the most predominant (Fig 1).

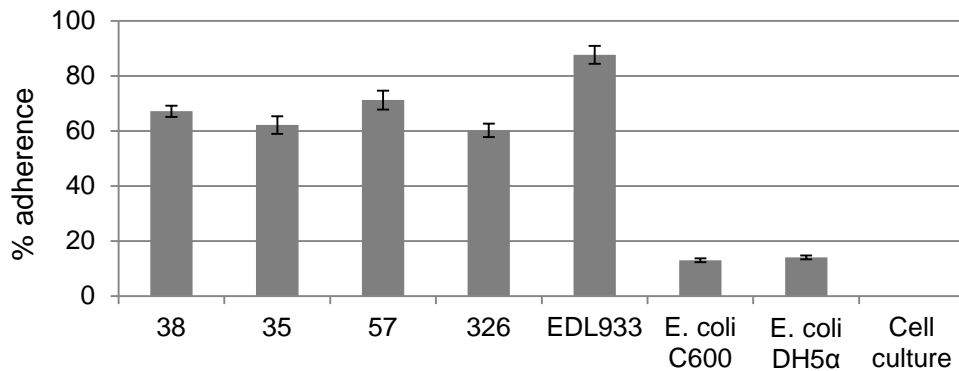


**FIGURE 1.** Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified to observed *saa* variants in different *saa*-positive strains. Lane MW contains DNA molecular size marker (100-bp DNA ladder).

Wild type strains, one for each *saa* variant (38, 35, 57 and 326) and host laboratory strains were assayed for their adherence phenotype on Hep-2 cells. The adhesion was observed by direct microscopy and Giemsa staining and by quantifying the cells not adhered to the cultures. As negative controls *E. coli* C600 and *E. coli* DH5 $\alpha$  were used. The *eae*-positive strain EDL933 was used as positive control. Adhered bacterial cells were clearly visible in the wild type strains after three hours of incubation, while no cells were observed in the negative controls (Fig 2A). Adherence in the *saa*-positive strains varied from 50% to 60% while the *eae*-positive strain showed an 87% of adhesion. The negative controls showed values below 10% (Fig 2B).



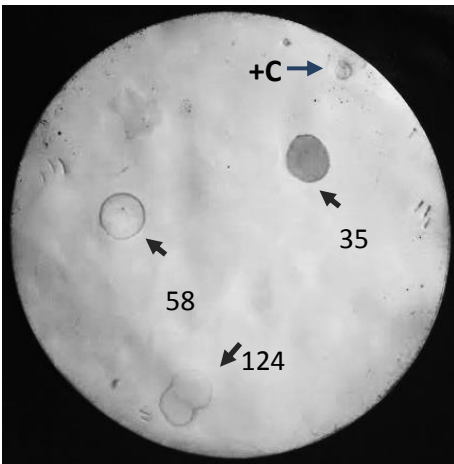
**Figure 2A.** Giemsa staining of Hep-2 cells infected after 3 hours with *saa*-positive strains (A: 38; B: 35; C: 57, D: 326), and with *E. coli* C600. F: cell culture control



**Figure 2B.** Analysis quantitative of adherence in Hep-2 by *saa*-positive strains (38, 35, 57, 326), *E. coli* O157:H7 EDL 933. as positive control and *E. coli* C600 and DH5α as negative controls. CC control correspond to cell culture without bacteria

### Analysis of *saa* in encapsidated DNA

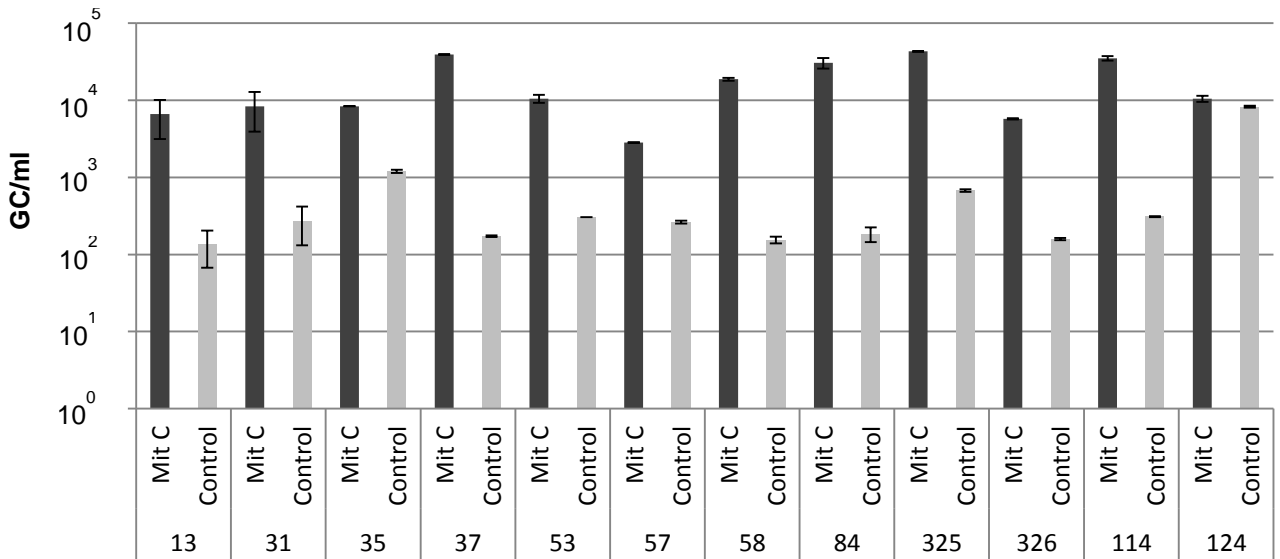
The first step towards the examination of phage mobilization of *saa* was the analysis of induced cultures of *saa*-positive bacterial strains from our collection (Table 2). The supernatant of the induced cultures was filtered, DNase treated and further treated with chloroform to eliminate non-encapsidated DNA or membrane vesicles containing DNA that could interfere in our results.



A drop of the phage suspension was placed onto a monolayer containing laboratory host strain *E. coli*. After incubation, the drop was analyzed by observation of lysis and by plaque blots using a DIG-*saa*-specific probe (Fig. 3). Visible zone of lysis was observed on the bacterial monolayer and positive signals were found after hybridization with the *saa*-probe, suggesting the presence of infectious phages carrying *saa*.

**FIGURE 3.** Plaques of Saa phages obtained from phage suspension to induced *saa*-positive strains 35, 58 and 124 samples and using *E. coli* WG5 as host strain. Plaques were detected after hybridization with a DIG-*saa* probe. +C: *saa* amplification.

At this stage, we purified encapsidated DNA from the phage suspension and used it as template to quantify *saa* by qPCR. The number of gene copies (GC) in the supernatant of induced cultures showed values ranging from  $10^4$  to  $10^5$  GC/ml, 1-2  $\log_{10}$  units higher than in the non-induced cultures (Fig. 4). Controls of the samples before desencapsidation were also analyzed by real-time PCR and were found to be negative, confirming that *saa* was present in encapsidated DNA.



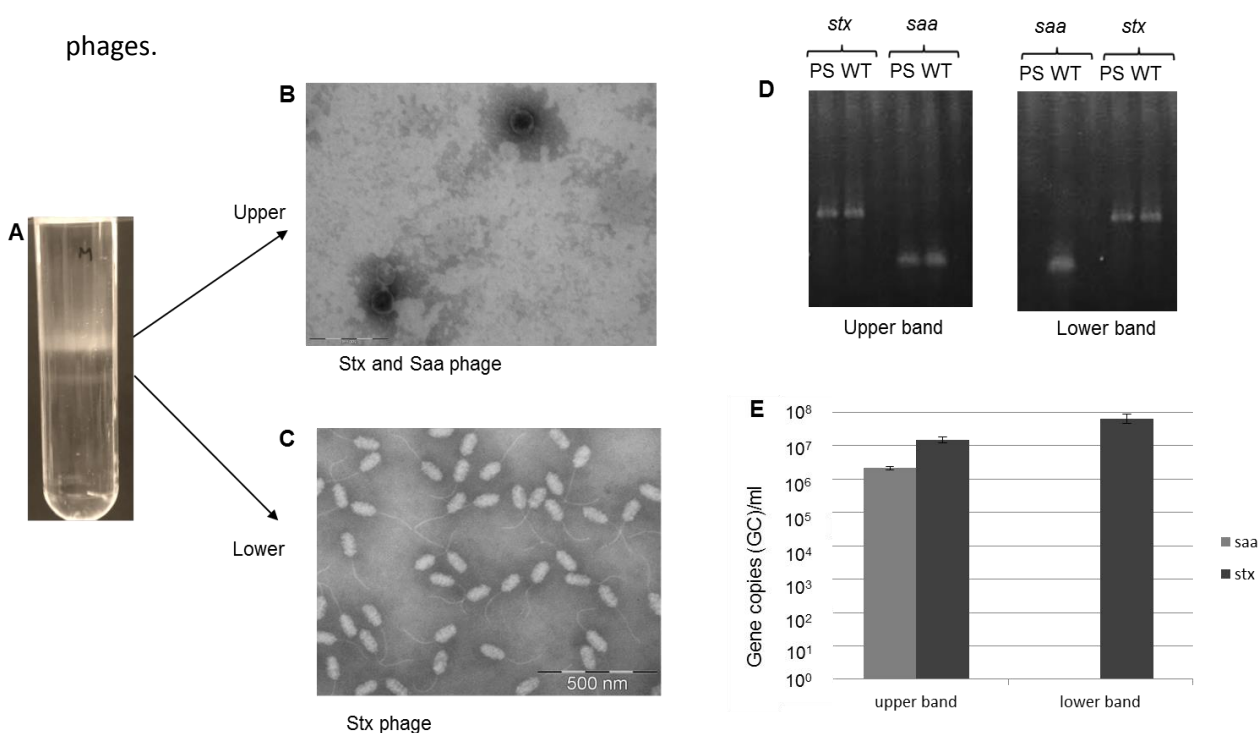
**FIGURE 4.** Quantification GC/ml of *saa* about phage DNA extraction with and without Mitomycin C

#### **Analysis of plaques of lysis for *saa* and *stx*.**

The phage suspensions were assayed from individual plaques of lysis, clearly only phages from *E. coli* strain 35 onto *E. coli* WG5 host strain showed plaques after plaque blot hybridization. The plaques generated were hybridized with the *saa* DIG-probe. In addition, we assayed a *stx* DIG-probe and found that both probes simultaneously hybridized the same plaque. A 10% of the plaques were randomly selected and sliced and phage DNA was extracted to analyze the genes by conventional PCR. Each plaque was positive for both *saa* and *stx* genes, suggesting that either *saa* could actually be using the Stx phage capsid for its mobilization or that both genes were encapsidated in another phage-derived element present in the phage suspension and able to cause lysis.

## Electron microscopy detection

Phage suspensions of strain 35 were used to evaluate the morphology of particles harboring *saa*. Since this strain also carries a Stx phage, and to separate both particles, phages were purified by successive CsCl gradients. In a first step of purification, two bands were observed (Fig 5), a low density band corresponding to a density of  $1.4 \pm 0.1 \text{ g/ml}^{-1}$ , and a second high density band of  $1.5 \pm 0.1 \text{ g/ml}^{-1}$ . Both bands were further purified by two successive steps of CsCl gradients to obtain separated particles. Electron microscopy showed a *Siphoviridae* phage with long head of  $40 \times 100 \text{ nm}$  and a non-contractile tail of  $180\text{-}200 \text{ nm}$  long in the lower band. Conventional PCR and quantification by qPCR of *stx* in phage DNA from phages in the lower band confirmed that it contained Stx phages and no detectable presence of *saa* phages.



**FIGURE 5.** CsCl gradients (A) of phage suspension obtained with strain 35. The two bands obtained were punctured and observed by electron microscopy. The bar in electron micrograph corresponding to the upper band (B) was 200nm and in the lower band (C) 500nm. Viral DNA was extracted from each band and *stx* and *saa* were amplified by end-point PCR (D) WT: Wild type strain used as control. PS: Phage suspension *stx* and *saa* quantification in each band (E) by qPCR..

The upper band purified from the CsCl gradients showed a short-tailed phage with isometric capsid of 50 nm that could correspond to *Podoviridae* morphology. PCR analysis revealed the presence of *stx* ( $10^7$ GC/ml) and *saa* ( $10^6$ GC/ml) genes in encapsidated DNA from the upper band. It was then suspected that that the phages observed in this band should be phage particles containing either *saa* or *stx*. The difference of 1  $\log_{10}$  between *saa* and *stx* GC could be attributed to a higher induction rates of Stx phages, in accordance with previous reports (Imamovic & Muniesa, 2012), compared with the increase in the number of *saa* copies after mitomycin C treatment.

### **Protein characterization**

The upper band extracted from CsCl gradients where *saa* particles were located was purified and observed in a SDS-PAGE gel. The majority protein bands observed were further analyzed by mass chromatography. Two major proteins were selected and these corresponded to two major proteins, P1 and P2. P1 band is majority composed by two proteins identified as highly homologues to U5P439 and M1FPN2 (table 4), described as phage proteins. U5P439 correspond to a *Shigella* phage protein not characterized and M1FPN2 are described in bacteriophages as part of their capsid. In addition, P2 contains homologues to tails health and portal phage proteins (table 4). In addition, when looking protein M1FPN2, belongs to a family that comprises homologue to the protein of a gene transfer agent (GTA) described in arqueas (Lang & Beatty, 2001).



**Table 4.** Homology of the two proteins analyzed by protein mass chromatography with previously submitted sequences

Protein	Accession	Description Database	Score	Coverage
P1	U5P439	Uncharacterized protein OS=Shigella phage SfIV	1778,5	82,12
	M1FPN2	Phage major capsid protein OS=Enterobacteria phage Sfl	358,19	44,64
P2	M1FN90	Tails heath protein OS=Enterobacteria phage Sfl	230,63	35,74
	P03710	Portal protein B OS=Enterobacteria phage lambda	108,47	45,22

### Animal and urban wastewater

To evaluate the extent of particles harboring *saa* in the environment, *saa* was analyzed in the viral DNA fraction of 122 environmental water samples containing fecal pollution from different origin. 39% of the samples from human origin (sewage) were *saa* positive, followed by 41 % of cattle samples, and 48% of both swine and poultry samples. The average of GC among all sample origins was very similar,  $10^3$  GC/ml (Fig 6). The samples containing swine and poultry origin showed a greater dispersion of GC/ml where the 75% of the positive samples are grouped.



**Figure 6.** Number of *saa* copies ( $\log_{10}$  GC/ml) in phage DNA from raw sewage, cattle, swine and poultry wastewater positive samples. The percentage of positive samples within each group is indicated in brackets among the total number of samples analyzed. Within the box plot chart, the cross-pieces of each box plot represent (from top to bottom) maximum, upper-quartile, median (black bar), lower-quartile, and minimum values. Black diamond shows the mean value. The grey boxes in the box plot chart include samples showing values within the 75th percentile and white boxes samples showing values within the within the 25th percentile.

## DISCUSSION

Virulence characteristics, especially adherence mechanisms of LEE-negative STEC strains, are still under study. Paton et al. (2001) described a novel adhesin termed Saa (for STEC autoagglutinating adhesin), which is encoded on a megaplasmid of LEE-negative STEC strains of serotypes O113:H21, O91:H21, and O48:H21, responsible of some outbreaks. *saa*-positive strains are detected more frequently in STEC strains from bovines, than in those from humans (Jenkins et al., 2003) and *saa* is nearly ubiquitous among STEC strains producing Stx1c (Friedrich et al., 2003).

Despite *saa* was previously described in the megaplasmid pO113, in the environmental STEC *saa*-positive strains of this study the plasmid was not identified, although still the presence

of *saa* was clear. All the *saa*-positive environmental strains assayed were able to express the gene, in accordance with a previous study demonstrating that the capacity of adhesion to epithelial cells is independent to the variant of *saa* encoded (Toma *et al.*, 2008).

From the electron microscopy assays, it is clear the presence of Stx phages in the lower CsCl band that only showed *Siphoviridae* morphology and where only *stx* was detected. Instead, in the lower band, it could be suspected that the particles harboring *saa* are of *Podoviridae* morphology. However, the fact that we always detected *saa* together with *stx*, suggests the possibility of a population of phage particles harboring different genes. Moreover, the presence of *stx* phage particles in the upper band together with the simultaneous detection of *saa* and *stx* GC in high densities in the band and the detection of both genes in the plaques of lysis generated, hampered the purification of a single sort of particles that could have allowed a complete sequencing of their DNA. These observations strongly suggest that the particles where *saa* is located could be the product of random, non-specialized packaging of the gene, as occurs in generalized transduction or similar to the packaging mechanisms described with GTAs (Lang *et al.*, 2012). This hypothesis could also be compatible with the previous description of a megaplasmid, since literally all fragments of bacterial DNA are susceptible to be packaged by these particles.

Mass spectrometer analysis of the *saa*-purified phage upper band of the CsCl gradient revealed the presence of two main phage capsid proteins. Since mainly only *Podoviridae* morphological type was observed in this band, it is likely to think that these proteins belong to these particles. The sequences of the encoding capsid protein confirmed its phage origin

and support our previous conclusions because of its close homology with GTA proteins. GTAs are tailed phage-like entities with the capacity to pack and transfer random pieces of the host genome (Guy et al., 2013; Lang et al., 2012) and have been reported in alphaproteobacteria isolated from the oceans (Lang and Beatty, 2007; McDaniel et al., 2010, 2012). The methodologies used here for the determination of phage or phage-derived particles would allow detection of either phages or GTAs (Brown-Jaque *et al.*, 2015). The presence of GTA in *Enterobacteriaceae* or *Bacteroidetes* has not been reported yet. However, in previous studies (Asadulghani *et al.*, 2009) it was demonstrated that many *E. coli* O157 strains possessed remnant prophages that could be the origin of these phage-derived particles. Assuming that *saa* could be mobilized by bacteriophages, or phage-related particles, transduction of *saa* is potentially possible by acquisition of the adherence phenotype in the cells that have incorporated the gene after transduction. Nevertheless, our attempts to obtain *saa*-positive lysogens in this study were unsuccessful. If the particles detected were not temperate phages but other particles, lysogens would not be generated. Moreover, to achieve transduction of *saa* to host strain it would be necessary, not only to have a strain sensitive to the particle, but also that recombination of this DNA with the host chromosome occurs, since these particles lack the genetic content required for phage DNA insertion.

The presence of *saa* in the viral DNA fraction of the samples from animal and human origin corroborates the hypothesis that *saa* can be mobilized by phage particles. The fact that samples from different origins showed very similar *saa* GC values could indicate the presence of GTA-like mechanism spreading at similar frequencies. Otherwise, if there was a

mechanism of generalized or specialized transduction, differences in GC values would be observable depending on the amount of host strains inducing the phage or generating generalized transducing particles.

Finally, the description of virulence genes as *saa*, which has been described in a megaplasmid but can be mobilized through some type of protein capsid may imply that GTAs can occur in bacterial species such as *E. coli*. If these observations were confirmed, it would open a new perspective suggesting that this mobilization should not be exclusive to *saa*, but could be extended to other genes. Then, it could be considered as a strategy used by STEC for the dissemination of its genetic content and would explain previous observations with Stx phages (Imamovic *et al.*, 2010; Martinez-Castillo *et al.*, 2013). For instance, that infectivity not always corresponds to the GC values obtained, or that Stx phages detected in a sample are infectious but not able to propagate exponentially (Martinez-Castillo *et al.*, 2013). Then it should be considered that a fraction of Stx phages detected by qPCR in the environment might actually be *stx* GTA carriers. GTAs and related particles could mobilize bacterial genes and disperse the bacterial genetic heritage to increase the variability of the microbial world.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2009-07576 and AGL2012-30880), the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043) and by the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB). Alexandre Martínez-Castillo has an FPI grant from the Ministry of Education and Science.

## REFERENCES

- Allué-Guardia, A., García-Aljaro, C. & Muniesa, M. (2011).** Bacteriophage-encoding cytolethal distending toxin type V gene induced from nonclinical *Escherichia coli* isolates. *Infect Immun* **79**, 3262–72.
- Asadulghani, M., Ogura, Y., Ooka, T., Itoh, T., Sawaguchi, A., Iguchi, A., Nakayama, K. & Hayashi, T. (2009).** The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog* **5**, e1000408.
- Asakura, M., Hinenoya, A., Alam, M. S., Shima, K., Zahid, S. H., Shi, L., Sugimoto, N., Ghosh, A. N., Ramamurthy, T. & other authors. (2007).** An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14483–8.
- Bettelheim, K. A. (2007).** The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol* **33**, 67–87.
- Blanch, A. R., García-Aljaro, C., Muniesa, M. & Jofre, J. (2003).** Detection, enumeration and isolation of strains carrying the *stx2* gene from urban sewage. *Water Sci Technol* **47**, 109–16.
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W. & Muniesa, M. (2015).** CRE. *Plasmid* **79C**, 1–7.
- Brüssow, H., Canchaya, C. & Hardt, W.-D. (2004).** Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 560–602, table of contents.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J. & Muniesa, M. (2011).** Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* **6**, e17549.
- Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R. M. & Hartland, E. L. (2002).** Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**, 6761–9.
- Imamovic, L. & Muniesa, M. (2012).** Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS One* **7**, e32393.
- Imamovic, L., Ballesté, E., Jofre, J. & Muniesa, M. (2010).** Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5693–701.

**Jenkins, C., Perry, N. T., Cheasty, T., Shaw, D. J., Frankel, G., Dougan, G., Gunn, G. J., Smith, H. R., Paton, A. W. & Paton, J. C. (2003).** Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J Clin Microbiol* **41**, 1775–8.

**Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D. & Kaper, J. B. (1990).** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7839–43.

**Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123–40.

**Lang, A. S., Zhaxybayeva, O. & Beatty, J. T. (2012).** Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol* **10**, 472–82.

**Lang, A. S. & Beatty, J. T. (2001).** The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus* and ‘constitutive transduction’ in prokaryotes. *Arch Microbiol* **175**, 241–249.

**Leyton, D. L., Sloan, J., Hill, R. E., Doughty, S. & Hartland, E. L. (2003).** Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. *Infect Immun* **71**, 6307–19.

**Loukiadis, E., Nobe, R., Herold, S., Tramuta, C., Ogura, Y., Ooka, T., Morabito, S., Kérourédan, M., Brugère, H. & other authors. (2008).** Distribution, functional expression, and genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**, 275–85.

**Lucchesi, P. M. A., Krüger, A. & Parma, A. E. (2006).** Distribution of *saa* gene variants in verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and food. *Res Microbiol* **157**, 263–6.

**Martinez-Castillo, A., Quirós, P., Navarro, F., Miró, E. & Muniesa, M. (2013).** Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl Environ Microbiol* **79**, 4862–8.

**Martínez-Castillo, A., Allué-Guardia, A., Dahbi, G., Blanco, J., Creuzburg, K., Schmidt, H. & Muniesa, M. (2012).** Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater. *Environ Microbiol Rep* **4**, 147–55.

**McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1995).** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1664–8.

**Newland, J. W., Strockbine, N. A., Miller, S. F., O’Brien, A. D. & Holmes, R. K. (1985).** Cloning of Shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of *Escherichia coli*. *Science* **230**, 179–81.

**Newton, H. J., Sloan, J., Bulach, D. M., Seemann, T., Allison, C. C., Tauschek, M., Robins-Browne, R. M., Paton, J. C., Whittam, T. S. & other authors. (2009).** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. *Emerg Infect Dis* **15**, 372–80.

**O'Brien, A. D., Newland, J. W., Miller, S. F., Holmes, R. K., Smith, H. W. & Formal, S. B. (1984).** Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**, 694–6.

**Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K. & other authors. (2009).** Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17939–44.

**Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C. & Paton, J. C. (2001).** Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **69**, 6999–7009.

**Paton, A. W. & Paton, J. C. (2002).** Reactivity of convalescent-phase hemolytic-uremic syndrome patient sera with the megaplasmid-encoded TagA protein of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157. *J Clin Microbiol* **40**, 1395–9.

**Paton, J. C. & Paton, A. W. (1998).** Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**, 450–79.

**Perna, N. T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J. & other authors. (2001).** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**, 529–33.

**Prager, R., Annemüller, S. & Tschäpe, H. (2005).** Diversity of virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases-need for more detailed diagnostics. *Int J Med Microbiol* **295**, 29–38.

**Srimanote, P., Paton, A. W. & Paton, J. C. (2002).** Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **70**, 3094–100.

**Toma, C., Nakasone, N., Miliwebsky, E., Higa, N., Rivas, M. & Suzuki, T. (2008).** Differential adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring saa to epithelial cells. *Int J Med Microbiol* **298**, 571–8.

**USDA-FSIS. (2011).** *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in certain raw beef products.* *Fed Regist.*





#### **4.4 CAPITULO 4:**

**BaeSR, involucrado en las respuestas de estrés de membrana, confiere protección contra la conversión lisogénica por fagos Stx**



## **BaeSR, involucrado en las respuestas de estrés de membrana, confiere protección contra la conversión lisogénica por fagos Stx**

Lejla Imamovic, **Alexandre Martínez-Castillo**, Carmen Benavides y Maite Muniesa.

Infection and Immunity 2015 83(4): 1451-1457

### **Introducción**

Los fagos atemperados portadores de genes que codifican factores de virulencia son responsables de la conversión de bacterias no patógenas a patógenas (Canchaya *et al.*, 2003). Uno de los ejemplos es la toxina Shiga, cuyo gen se localiza en bacteriófagos atemperados que al lisogenizar cepas de *E. coli* genera cepas productoras de toxina shiga (STEC), que son cepas virulentas que pueden causar colítis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH).

El primer paso para que una cepa llegue a ser infectada por un fago es la unión de éste a los receptores de membrana de la bacteria, lo cual provoca la activación de señales a nivel de la membrana bacteriana, son las llamadas respuestas de estrés de membrana. El estrés causado por señales externas altera la membrana bacteriana, por lo que se produce una respuesta por parte de la bacteria mediante sistemas basados en señales de fosforilación. Hay 5 sistemas descritos: BaeSR, CpxAR, RcsBC, Psp y  $\sigma^E$  (Bury-Moné *et al.*, 2009). Estos sistemas provocan la activación de cascadas enzimáticas para responder al estímulo o daño sufrido.

RcsBC y CpxAR intervienen en procesos de adhesión bacteriana (Humphreys *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 2013), y BaeSR se ha descrito que actúa incrementando la resistencia de la bacteria frente a compuestos tóxicos (Raffa y Raivio, 2002). Además BaeSR activa un sistema denominado CRISPR/Cas que es el responsable de producir resistencia a la infección por fagos en bacterias y arqueas (Perez-Rodriguez *et al.*, 2011; Raivio, 2011).

## Objetivos y metodología

El objetivo del estudio es evaluar la relación entre sistemas de protección de estrés de membrana y la conversión lisogénica por fagos Stx de la bacteria. Para ello estudiaremos tres sistemas: BaeSR, RcsBC y CpxAR y su implicación en la formación de lisógenos con fagos Stx y por lo tanto la posible implicación en la generación de cepas STEC.

Para realizar el trabajo se utilizaron 8 fagos distintos de Stx:  $\Phi$ A9,  $\Phi$ VTB55,  $\Phi$ A75,  $\Phi$ A312,  $\Phi$ A534,  $\Phi$ A549,  $\Phi$ A557 y 993W. A los que se les había truncado el gen *stx<sub>2</sub>* con el gen de resistencia a cloranfenicol ( $\Delta$ *stx<sub>2</sub>::cat*). Se utilizó como cepa huésped la bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$  y para evaluar el efecto de los sistemas de estrés de membrana se generaron mutantes de BaeSR, RcsBC y CpxAR en esta cepa mediante reemplazo de los genes de cada vía por el gen de resistencia a tetraciclina ( $\Delta$ BaeSR::*tet*,  $\Delta$ RcsBC::*tet* y  $\Delta$ CpxAR::*tet*). Se usó como control la cepa DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* con un el plásmido pGEM-T-Easy que lleva clonado los genes del sistema BaeSR, complementando de tal manera la mutación y la misma cepa conteniendo el plásmido sin el *baeSR*.

Además se estudió la expresión de mRNA de BamA, el receptor de membrana de algunos fagos Stx, y su relación con los diferentes sistemas de estrés de membrana.

## Resultados

La primera parte del estudio se centró en analizar cuál de los tres sistemas de estrés podría tener una mayor implicación en la formación de lisógenos. Para ello se comparó la capacidad que tenían cepas a las que se les había truncado los genes implicados en la respuesta del estrés con una cepa salvaje, utilizando el fago 993W $\Delta$ *stx<sub>2</sub>::cat*. Los resultados revelaron un incremento muy elevado de lisógenos en la cepa DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* en comparación con una DH5 $\alpha$ . Los otros dos sistemas o no mostraron diferencias como el RcsBC o las diferencias fueron inversas (disminución) como fue el caso de CpxAR.

Se comparó la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) entre las cepas DH5 $\alpha$  y DH5 $\alpha$ *baeSR*, y sus lisógenos, DH5 $\alpha$  (993W) y DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* (993W), para determinar si habían diferencias en el fitness de la bacteria al llevar la mutación o al incorporar el fago de Stx. No se observó ninguna diferencia, siendo las tasas de crecimiento similares entre las 4 cepas.

Para descartar que la diferencia en la formación de lisógenos no se debiera a la diferente inducción entre cepas lisogénicas salvajes y mutantes para BaeSR, por lo que podría haber un aumento de lisis de los lisógenos, se comparó la diferencia de crecimiento tras ser inducidas con mitomicina los lisógenos de la cepa salvaje y la mutante. Se utilizó un fago 993W no recombinante y se observó por densidad óptica el crecimiento bacteriano y por qPCR se cuantificó el número de copias genómicas del fago que se producían tras la inducción con mitomicina C. Al evaluar la densidad de ambas poblaciones, después del tratamiento con mitomicina C, no se observaron diferencias significativas. Tampoco se observaron diferencias a las 6 y 18 horas, con presencia y ausencia de mitomicina C, en el número de fagos producidos entre la cepa salvaje y la mutante.

Debido a que los fagos Stx son un grupo muy heterogéneo, se estudió que el incremento en la formación de lisógenos en la cepa mutante para el sistema BaeSR no fuera debido únicamente al fago 993W, si no que fuera un fenómeno general en otros fagos Stx. Para ello se realizó un ensayo en el que se comparaba la distinta capacidad de formación de lisógenos de la cepa salvaje, la cepa DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*, la cepa DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* complementada con pGEM::*baeSR*, y, como control, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* conteniendo el plásmido pGEM sin el gen *baeSR*, para descartar que el efecto observado no se debiera al plásmido en sí mismo. La DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* presentó hasta 5 unidades logarítmicas más de lisógenos que la DH5 $\alpha$ . Además el efecto de *baeSR* en la formación de lisógenos se confirmó al complementar la cepa mutante, ya que disminuyó el número de lisógenos hasta 3 unidades logarítmicas. El control de plásmido sin inserto reveló que el plásmido per se, no era el causante de este efecto.

Para relacionar el sistema BaeSR y los fagos Stx, se propuso estudiar la relación entre BaeSR y la expresión de la proteína de membrana BamA (YaeT) que actúa como receptor

para los fagos Stx de cola corta (*Podoviridae*), grupo al que pertenecen los fagos Stx de nuestro estudio. Se realizaron experimentos de expresión de mRNA de *bamA* entre una cepa DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*, la cepa con la mutación complementada, la salvaje y se incluyeron las cepas mutantes para los sistemas  $\Delta$ RcsBC y  $\Delta$ CpxAR. Para comparar el nivel de expresión se estandarizó utilizando el mRNA16S y calculando para ello el “*Fold change*”. Se observó un incremento significativo de la expresión de BamA entre la DH5 $\alpha$ *baeSR* y la salvaje. No observándose ningún incremento entre el resto de cepas, incluyendo la salvaje.

## Discusión

El papel que desarrollan los fagos Stx en la virulencia de las *E. coli* ha sido ampliamente descrito (Neely y Friedman, 1998; Zhou *et al.*, 2010), siendo un vehículo para que cepas de *E. coli* no virulentas se convierta en productoras de Stx y pasen a ser patógenas, como por ejemplo la cepa causante del brote ocurrido en Alemania en 2011 (Buchholz *et al.*, 2011; King *et al.*, 2012).

En este estudio hemos analizado la capacidad de formación de lisogenos de Stx en *E. coli*, comprobando si había alguna vía de estrés de membrana involucrada en la respuesta de la bacteria para impedir su formación. Se estudiaron tres vías de estrés, y se determinó que el sistema BaeSR estaba implicado en la formación de lisogenos. Mutaciones en el sistema CpxAR produjeron pequeñas disminuciones significativas en la producción de lisógenos y, en cambio, el sistema RcsBC no se observó que jugara ningún papel en la formación de lisogenos. Además el efecto observado en BaeSR se repitió usando diferentes poblaciones de fagos Stx.

Las diferencias en el número de lisogenos observados no pueden ser atribuidas a un coste en el fitness bacteriano debido a la mutación o por la incorporación del fago, tal y como se demostró. Además los niveles de inducción de fagos fueron similares entre la cepa mutante y la salvaje, por lo que el menor número de lisogenos observado en la cepa salvaje

no era debido a lisis bacteriana causada por la inducción de los fagos. La hipótesis es que en los cultivos mutantes coexiste la población de células lisogénicas y no lisogénicas.

El sistema BaeSR está implicado con la resistencia de la bacteria a antibióticos o a resistencia a metales y participa en la regulación de elementos de la membrana bacteriana. Los bacteriófagos reconocen y se unen a receptores de la membrana para producir la infección (Samson *et al.*, 2013). Una de estos receptores es BamA, que es una proteína conservada de membrana en las bacterias Gram negativas y usada por los fagos Stx de cola corta para unirse a la membrana bacteriana (Islam *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2007). El aumento de la expresión de BamA en ausencia de BaeSR implica un aumento de las infecciones por Stx de la bacteria y provee una explicación plausible a nuestros resultados ya que se correspondería a una mayor frecuencia en la formación de lisógenos.





# BaeSR, Involved in Envelope Stress Response, Protects against Lysogenic Conversion by Shiga Toxin 2-Encoding Phages

Lejla Imamovic, Alexandre Martínez-Castillo, Carmen Benavides,  Maite Muniesa

Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Infection and lysogenic conversion with Shiga toxin-encoding bacteriophages (Stx phages) drive the emergence of new Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. Phage attachment to the bacterial surface is the first stage of phage infection. Envelope perturbation causes activation of envelope stress responses in bacterial cells. Although many external factors are known to activate envelope stress responses, the role of these responses in the phage-bacterium interaction remains unexplored. Here, we investigate the link between three envelope signaling systems in *E. coli* (RcsBC, CpxAR, and BaeSR) and Stx2 phage infection by determining the success of bacterial lysogenic conversion. For this purpose, *E. coli* DH5 $\alpha$  wild-type (WT) and mutant strains lacking RcsBC, CpxAR, or BaeSR signaling systems were incubated with a recombinant Stx2 phage (933W). Notably, the number of lysogens obtained with the BaeSR mutant was 5 log<sub>10</sub> units higher than with the WT, and the same differences were observed when using 7 different Stx2 phages. To assess whether the membrane receptor used by Stx phages, BamA, was involved in the differences observed, *bamA* gene expression was monitored by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) in all host strains. A 4-fold-higher *bamA* expression level was observed in the BaeSR mutant than in the WT strain, suggesting that differential expression of the receptor used by Stx phages accounted for the increase in the number of lysogenization events. Establishing the link between the role of stress responses and phage infection has important implications for understanding the factors affecting lysogenic conversion, which drives the emergence of new pathogenic clones.

Temperate phages are responsible for the conversion of non-pathogenic strains of bacteria to pathogenic strains by transduction of virulence genes (1). Well-known examples are Shiga toxin (Stx) phages, which carry the genes for Shiga toxin (*stx*). Stx phages can cause the conversion of *Escherichia coli* and bacteria of other genera to Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and other Shiga-toxigenic pathogens (2). A recent example is the STEC outbreak in Germany in May 2011, where an enteroaggregative *E. coli* O104:H4 strain incorporated an Stx2 phage (3, 4). Because the lysogeny of *E. coli* by Stx phages has relevant implications for their pathogenicity, a better understanding of the molecular mechanisms underlying phage-host interaction is a challenge for researchers and could help in designing strategies to avoid lysogenization by Stx phages.

The first step in phage infection is attachment to the specific receptor on the bacterial surface. The maintenance, adaptation, and protection of the bacterial envelope are essential for bacteria. Stresses that damage and alter the bacterial envelope can lead to activation of stress responses in bacteria by means of various phosphorelay signaling systems (5). In *E. coli*, five different envelope stress responses have been identified: BaeSR, CpxAR, RcsBC, Psp, and  $\sigma^E$  (5, 6). Each response triggers a signaling cascade that leads to the regulation of factors needed to combat envelope damage or to respond to the stress (5). Some envelope stress response signaling has been linked to virulence in Gram-negative bacteria (7, 8). For instance, the RcsBC signaling system enhances the locus of enterocyte effacement (LEE) and the adherence phenotype of the STEC O157:H7 isolate TW14359, the isolate responsible for a 2006 outbreak in the United States (8). CpxAR is involved in bacterial adhesion (6, 7) and is activated during prophage induction in *E. coli* (9). Finally, BaeSR, which mediates increased resistance to toxic compounds (10), is related to envelope biogenesis (10) and could regulate the expression of surface elements (10). Moreover, BaeSR activates the promoter of the *casA* gene, which is part

of the CRISPR/Cas response, conferring resistance against phages in bacteria and archaea (11, 12). BaeSR consists of a histidine sensor kinase (BaeS) residing in the inner membrane and a response regulator (BaeR) in the cytoplasm (6, 10).

We hypothesized that by affecting the phage-bacterium interaction, envelope stress responses might impact the phage lysogenic conversion, but this possibility has not been well explored. This study evaluates three different membrane stress responses and their involvement in lysogenic conversion with Stx phages, which have been directly implicated in the emergence of new pathogenic STEC strains.

## MATERIALS AND METHODS

**Phages, plasmids, and bacterial strains.** 933W is a reference phage isolated from a STEC strain (13), and the other seven Stx2 phages were induced from STEC strains isolated from cattle (14). All the phages were labeled with a *cat* gene (from plasmid pKD3) (Table 1) inserted into the *stx<sub>2</sub>* gene (15) (*stx<sub>2</sub>::cat* phages) (Table 1) and were used to assess lysogenic

Received 14 November 2014 Returned for modification 3 January 2015

Accepted 21 January 2015

Accepted manuscript posted online 26 January 2015

Citation Imamovic L, Martínez-Castillo A, Benavides C, Muniesa M. 2015. BaeSR, involved in envelope stress response, protects against lysogenic conversion by Shiga toxin 2-encoding phages. *Infect Immun* 83:1451–1457. doi:10.1128/IAI.02916-14.

Editor: S. M. Payne

Address correspondence to Maite Muniesa, mmuniesa@ub.edu.

L.I. and A.M.-C. contributed equally to the study.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.02916-14>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.02916-14

TABLE 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Laboratory strain K-12, <i>recA</i> negative	Gibco-BRL
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\Delta$ <i>baeSR</i> :: <i>tet</i>	Strain where <i>BaeSR</i> has been replaced by <i>tet</i>	19
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\Delta$ <i>baeSR</i> :: <i>tet</i> (pGEM:: <i>baeSR</i> )	DH5 $\alpha$ $\Delta$ <i>baeSR</i> complemented with <i>baeSR</i>	This study
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\Delta$ <i>baeSR</i> :: <i>tet</i> (pGEM)	DH5 $\alpha$ $\Delta$ <i>baeSR</i> complemented with pGEM-T Easy without <i>baeSR</i>	This study
<i>E. coli</i> C600 (933W)	Lysogen with phage 933W	13
<i>E. coli</i> C600 (933W $\Delta$ <i>stx</i> <sub>2</sub> :: <i>cat</i> )	Lysogen with recombinant phage 933W	15
<i>E. coli</i> C600 ( $\Phi$ A9 $\Delta$ <i>stx</i> <sub>2</sub> :: <i>cat</i> )	Lysogen with recombinant phage $\Phi$ A9	15
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\Phi$ VTB55 $\Delta$ <i>stx</i> <sub>2</sub> :: <i>cat</i> )	Lysogen with recombinant phage $\Phi$ VTB55	15
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\Phi$ A75 $\Delta$ <i>stx</i> <sub>2</sub> :: <i>cat</i> )	Lysogen with recombinant phage $\Phi$ A75	15
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\Phi$ A312 $\Delta$ <i>stx</i> <sub>2</sub> :: <i>cat</i> )	Lysogen with recombinant phage $\Phi$ A312	15
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\Phi$ A534 $\Delta$ <i>stx</i> <sub>2</sub> :: <i>cat</i> )	Lysogen with recombinant phage $\Phi$ A534	15
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\Phi$ A549 $\Delta$ <i>stx</i> <sub>2</sub> :: <i>cat</i> )	Lysogen with recombinant phage $\Phi$ A549	15
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\Phi$ A557 $\Delta$ <i>stx</i> <sub>2</sub> :: <i>cat</i> )	Lysogen with recombinant phage $\Phi$ A557	15
<b>Plasmids</b>		
pKD46	Containing Red recombinase system	GenBank AY048746; 18
pKD3	Source of chloramphenicol resistance gene ( <i>cat</i> )	GenBank AY048742; 18
pACYC184	Source of tetracycline resistance gene ( <i>tet</i> )	GenBank X06403; 38
pGEM-T Easy	High-copy-number plasmid	Promega
pGEM-T Easy:: <i>baeSR</i>	Containing <i>baeSR</i> gene	This study

conversion of *E. coli* DH5 $\alpha$  (Table 1), a *recA*-negative *E. coli* K-12 derivative. The plasmids used to generate the mutant strains and the recombinant phages or to clone the *baeSR* operon for the complementation assay are listed in Table 1.

The bacterial strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth and on LB agar. When necessary, media were supplemented with chloramphenicol (Cm) (15  $\mu$ g/ml), tetracycline (Tc) (10  $\mu$ g/ml), and ampicillin (Ap) (100  $\mu$ g/ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

**Preparation of phage lysate.** LB cultures of the lysogens containing recombinant phages with the *stx*<sub>2</sub>::*cat* construct were grown at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.5. Mitomycin C was added to a final concentration of 0.5  $\mu$ g/ml, and the cultures were incubated for 7 h at 37°C in the dark. After incubation, the cultures were filtered through low-protein-binding 0.22- $\mu$ m-pore-size membrane filters (Millex-GP; Millipore, Bedford, MA). Infectious recombinant phages were counted by the double-agar-layer method using the *E. coli* DH5 $\alpha$  strain as the host, followed by hybridization with the *cat*-Dig probe as described previously (15). The nonrecombinant reference phage 933W (containing the intact *stx*<sub>2</sub> gene) was also used in phage induction experiments.

**Lysogenization by Stx2 phages.** Suspensions of eight recombinant Stx2 phages containing 10<sup>6</sup> PFU/ml, obtained and enumerated as described above, were used to lysogenize the host strains (Table 1). One milliliter of the phage suspension was incubated with 1 ml of mid-exponential-phase cultures (OD<sub>600</sub> = 0.3) of each host strain and incubated at 37°C for different time intervals. After incubation, the mixture was decimally diluted, plated in LB agar plus Cm, and incubated at 37°C for 18 h. The colonies obtained were confirmed as lysogens by PCR using the primer combination UP 378/Cm-3 (see Table S1 in the supplemental material).

**Evaluation of bacterial growth rates.** The growth rates of all the strains were monitored by optical density (OD<sub>600</sub>) and by colony counts on LB agar supplemented with the appropriate antibiotics at different time intervals. The exponential growth rate ( $\mu$ ) was calculated in three independent experiments by the following formula:  $\mu = (\ln N_t - \ln N_0)/(t - t_0)$ , where  $N_t$  is the number of cells (CFU) at a given time,  $N_0$  is the initial number of cells (CFU), and  $t$  is the time in hours.

**PCR techniques.** PCRs were performed with a GeneAmp PCR system 2400 (Life Technologies, Barcelona, Spain). Phage and bacterial DNA was

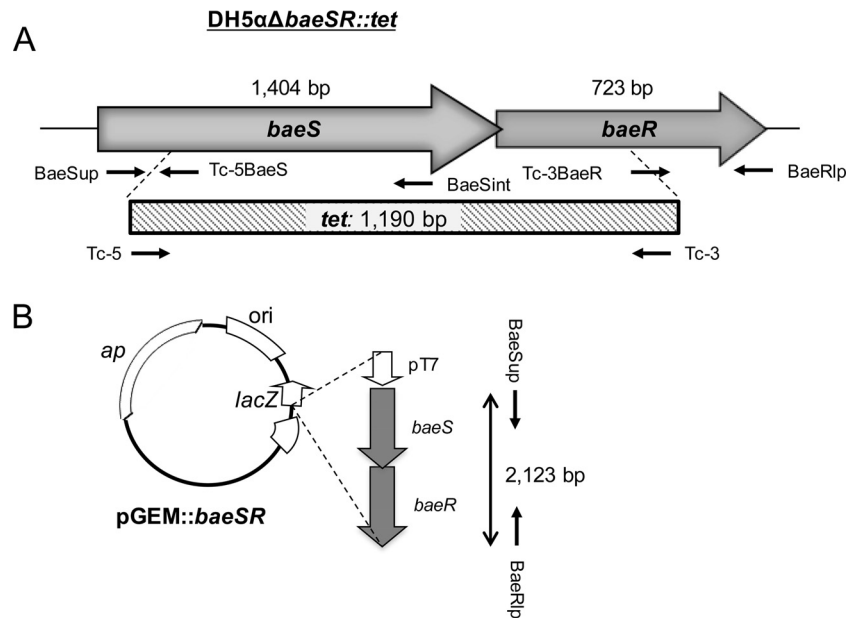
extracted as previously described (14) and used for the endpoint PCR amplification or for the *stx*<sub>2</sub> quantitative PCR (qPCR) (16) with the oligonucleotides listed in Table S1 in the supplemental material.

**RNA isolation and real-time quantitative PCR.** Total RNA was extracted from 1 ml cells grown to log phase (OD<sub>600</sub> = 0.6) at 37°C using the SV Total RNA Isolation System (Promega) following the manufacturer's instructions. An 8.5- $\mu$ l volume of the RNA extracted was used for each qPCR assay (*E. coli* 16S rRNA genes or *bamA*) (see Table S1 in the supplemental material); reverse transcription (RT) to cDNA and DNA amplification were carried out in a one-step reaction using the Power SYBR green RNA-to-CT 1-Step Kit (Life Technologies), following the manufacturer's protocol. Amplification was done under standard conditions in a StepOne Real Time PCR System (Life Technologies) in a final volume of 20  $\mu$ l per reaction. Relative quantification was evaluated using the comparative threshold cycle ( $C_T$ ) method (17), for which the  $C_T$  obtained with the qPCR assay of the 16S rRNA genes of *E. coli* (see Table S1 in the supplemental material) was used as an internal control for normalization of the data. The relative fold changes in transcript levels and standard deviations were calculated as the means of the results of three independent experiments.

**Gene knockouts and complementation assay for the three envelope stress responses.** *E. coli* strain DH5 $\alpha$  was used to generate three mutants in *BaeSR*, *RcsBC*, or *CpxAR* envelope stress responses by replacing the genes that encode those proteins with a *tet* cassette from plasmid pACYC184 (Table 1), using the Red recombinase method (15, 18, 19).

For complementation assays, *E. coli* DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*::*tet* (here referred to as DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*) (Fig. 1) was complemented with the pGEM-T Easy vector containing *baeSR*, a 2,123-bp fragment obtained with primers *BaeSup*/*BaeRlp* (Fig. 1). DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* transformed with the pGEM-T Easy vector without a *BaeSR* fragment was used as a control. Insertion of the fragment and cloning in DH5 $\alpha$  electrocompetent cells were performed following the manufacturer's instructions. The presence of the construct in colonies grown in LB agar plus Tc was confirmed by conventional PCR and sequencing.

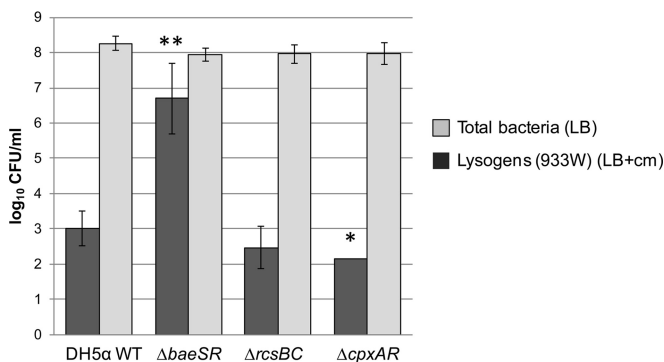
**Statistical analyses.** Data and statistical tests used the Statistical Package for Social Science software (SPSS). The differences between the numbers of lysogens obtained with the different strains and under different conditions were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA).



**FIG 1** Generation of the BaeSR mutant in *E. coli* DH5 $\alpha$ . (A) Positions and directions of transcription of the genes making up the BaeSR pathway in the host strains and the deletions used to generate the mutant DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeS* $\Delta$ *baeR*::*tet*. (B) The pGEM plasmid construct containing the *baeSR* fragment used for complementation experiments is cloned under the T7 RNA polymerase promoter (pT7).

## RESULTS

**Role of envelope stress responses in the generation of Stx2 lysogens.** To evaluate the role of envelope stress responses in the generation of Stx2 lysogens, DH5 $\alpha$  mutant strains lacking the envelope stress response signaling system BaeSR, RcsBC, or CpxAR were used as hosts for phages. The number of lysogens obtained with phage 933W $\Delta$ *stx*<sub>2</sub>::*cat* was compared with the WT DH5 $\alpha$  number. Mutations on RcsBC did not significantly ( $P = 0.319$ ) alter the number of lysogens compared with the WT (Fig. 2). Deletion of CpxAR caused a significant ( $P = 0.049$ ) reduction in the number of Stx2 lysogens compared with the WT strain. In contrast, a significant ( $P = 0.004$ ) increase in the generation of lysogens was observed when using DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* (Fig. 2). The total



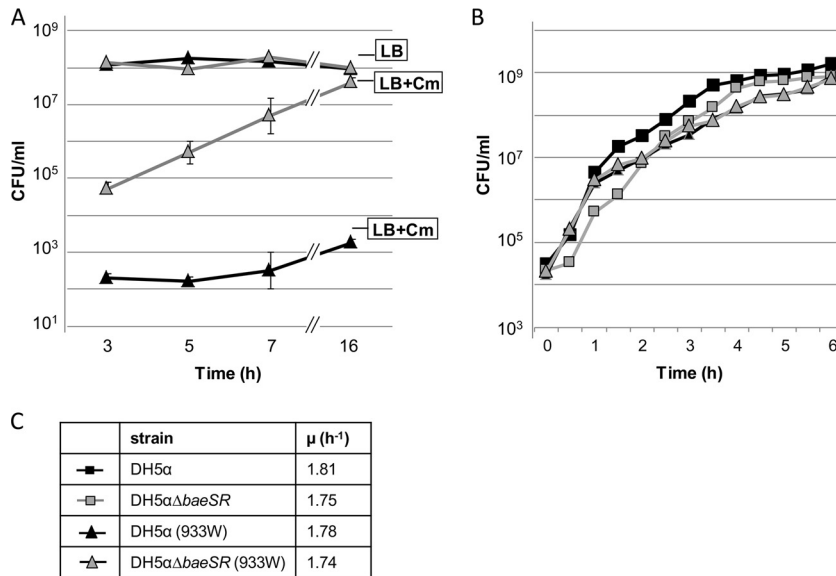
**FIG 2** Roles of BaeSR, RcsBC, and CpxAR membrane stress responses in the generation of lysogens. Generation of lysogens of phage 933W $\Delta$ *stx*<sub>2</sub>::*cat* was compared in the WT strain *E. coli* DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *rcsBC*, and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *cpxAR*. Total bacterial counts of each strain were obtained in LB agar without antibiotic selection. Lysogens of the 933W $\Delta$ *stx*<sub>2</sub>::*cat* recombinant phage in each strain were obtained in LB agar plus Cm. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (significant differences from the WT). The error bars indicate standard deviations.

counts for each mutant strain obtained in LB agar without antibiotic indicated that these differences were not caused by differential growth rates of the strains (Fig. 2). Between 10 and 20% of the lysogens of 933W $\Delta$ *stx*<sub>2</sub>::*cat* phage grown on LB-plus-Cm agar plates were further confirmed by PCR.

**BaeSR protects against lysogeny with the Stx2 phage 933W $\Delta$ *stx*<sub>2</sub>::*cat*.** Lysogenic conversion obtained with phage 933W $\Delta$ *stx*<sub>2</sub>::*cat* (from a phage lysate containing  $5 \times 10^6$  PFU/ml) was further evaluated at different times of phage-host bacterium contact (Fig. 3A). Lysogens were detected 3 h after DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* was incubated with Stx2 phages. An increase in lysogens was observed over time and was most likely due to duplication in the lysogenic population, which was also augmented with new lysogenic cells. The total numbers of cells (measured without antibiotic selection) in WT and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* cultures were the same, which confirms that the effect observed was not due to lysis of the host strain (Fig. 3B).

To compare the effects of the mutations on bacterial fitness, we calculated the exponential growth rate ( $\mu$ ) of the WT and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* strains and their respective 933W lysogens. Strains lacking the BaeSR envelope stress response had slightly reduced fitness compared to the WT (Fig. 3C). However, differences in the growth rates could not account for the lower number of lysogens obtained with the WT, because the WT showed growth equal to or slightly faster than that of the mutant.

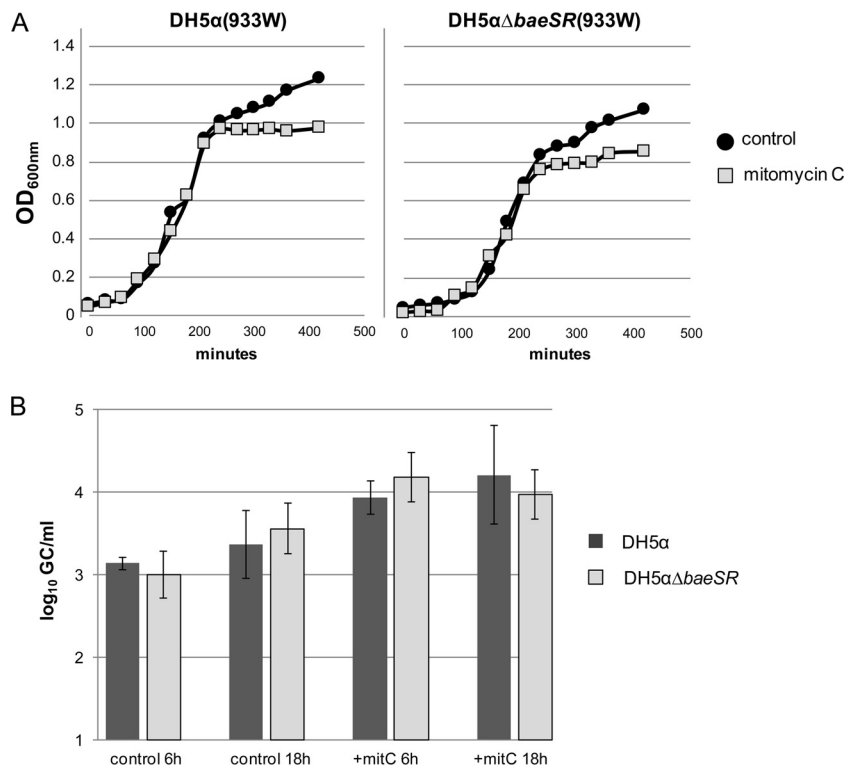
**Induction of phage 933W from DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* and DH5 $\alpha$  lysogens.** One plausible explanation for the results obtained could be that the WT lysogens and the BaeSR mutant lysogens had different phage induction abilities that could cause differential lysis of the lysogenic cells, thereby influencing the final numbers. To monitor the induction abilities of the lysogens, 933W phage lysogens were obtained after 18 h of incubation with DH5 $\alpha$  and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*. In these experiments, a nonrecombinant 933W phage was used, in order to apply the *stx*<sub>2</sub> qPCR-based protocol for



**FIG 3** (A) Effect of *baeSR* deletion on lysogenization of recombinant Stx2 phage 933W $\Delta$ stx<sub>2</sub>::cat. In every period, bacterial cells were plated in LB agar plus Cm for detection of lysogenic strains or in LB agar without antibiotic for detection of the total number of cells (CFU/ml). (B) Representative experiment on the growing curves of the *E. coli* DH5 $\alpha$  and BaeSR mutant host strains and in lysogens DH5 $\alpha$  (933W $\Delta$ stx<sub>2</sub>::cat) and DH5 $\alpha\Delta$ baeSR (933W $\Delta$ stx<sub>2</sub>::cat). The symbols are defined in panel C. (C) Growth rates of all the strains calculated with data from panel B. The error bars indicate standard deviations.

phage counting (16). Evaluation of the densities (OD<sub>600</sub>) of both cultures after mitomycin C treatment (time zero) showed similar patterns for the mutant and the WT strains (Fig. 4A). At 6 and 18 h and in the presence/absence of mitomycin C, no significant dif-

ferences (under all conditions, *P* values were >0.05) in the number of phages produced by the mutant and WT strains were observed (Fig. 4B). The numbers of phages produced were the same for both strains. Our results show that differences in phage induc-



**FIG 4** Evaluation of 933W phage induction in lysogens DH5 $\alpha$  (933W) and DH5 $\alpha\Delta$ baeSR (933W) with and without mitomycin C induction. (A) Densities of the cultures monitored by OD<sub>600</sub>. (B) qPCR evaluation of 933W phage particles (no. of gene copies/ml) at 6 and 18 h with or without mitomycin C (mitC) treatment. The error bars indicate standard deviations.



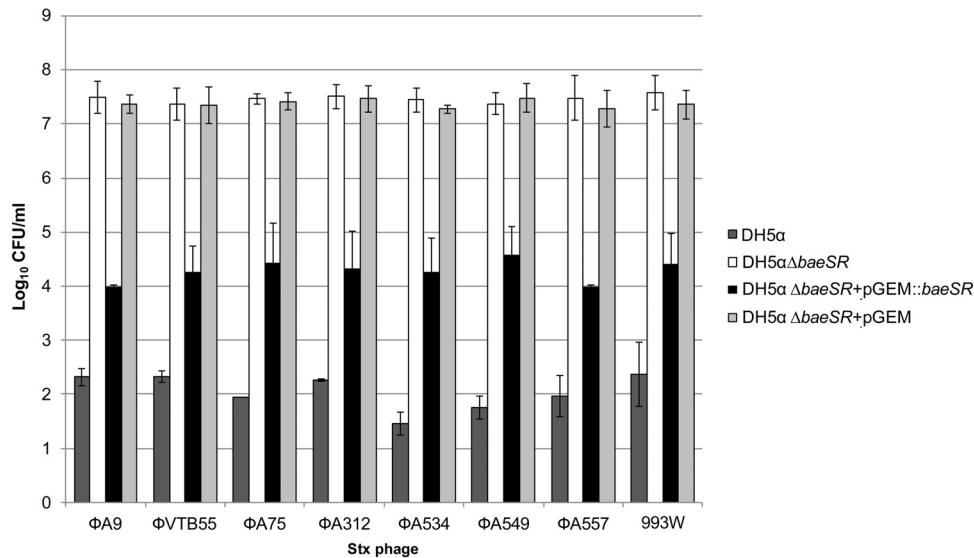


FIG 5 Generation of lysogens with various Stx recombinant phages in DH5 $\alpha$  and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* and complementation of DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* pGEM::*baeSR*. Lysogens of DH5 $\alpha$  WT and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* were grown in LB agar plus Cm. Lysogens of DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* complemented with pGEM::*baeSR* and control DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* with pGEM were grown in LB agar plus Cm plus Ap. The error bars indicate standard deviations.

tion, and hence in the lysis of the lysogens, were not the cause of the higher number of lysogens obtained with the mutant strain.

**Role of BaeSR in lysogenic conversion with different Stx2 phages.** Stx phages are a very heterogeneous group defined by the presence of *stx* in their genomes (2). For this reason, we wanted to assess whether the effect of BaeSR on the lysogenic conversion observed for phage 933W could also occur with other Stx2 phages. To do this, seven distinct recombinant Stx2 phages having the *stx*<sub>2</sub> gene truncated by a *cat* gene (Table 1) were used. The Stx phages were used to obtain lysogens in the host strains DH5 $\alpha$  and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*. To confirm the role of BaeSR, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* complemented with pGEM::*baeSR* was also included as a host strain. DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* with a pGEM vector without an insert was used as a negative control. The Stx2 phages used in this study differed genetically from each other, and some also had different insertion sites (14, 20). Phage lysates containing 10<sup>7</sup> PFU/ml were used for at least three to five independent assays.

The effect of BaeSR on the generation of lysogens was consistent for all Stx2 phages. The DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* strain showed at least 5 log<sub>10</sub> units more lysogens than the WT (Fig. 5). The role of the *baeSR* deletion in the number of lysogens was confirmed by *baeSR* complementation, with the resultant strain showing significantly ( $P = 0.0001$ ) fewer lysogens, 2.8 to 3.5 log<sub>10</sub> units less than the mutant strain (Fig. 5). The number of lysogens obtained with DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* containing the pGEM-T Easy vector without an insert (an average of 7.3 log<sub>10</sub> lysogens/ml for all phages) did not reveal significant differences ( $P = 0.394$ ) from the noncomplemented DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* strain.

We confirmed that no changes in the prophage insertion site could account for the differences observed. The insertion sites of the phages used in this study (*wrbA* for all phages except  $\Phi$ A9, which inserts in *yecE*) (20) were confirmed to be the same in the WT and in DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*.

**Reverse transcription-quantitative PCR assay of *bamA* expression.** BaeSR is involved in cell envelope stress responses (10). These responses often result in the alteration of proteins in the cell

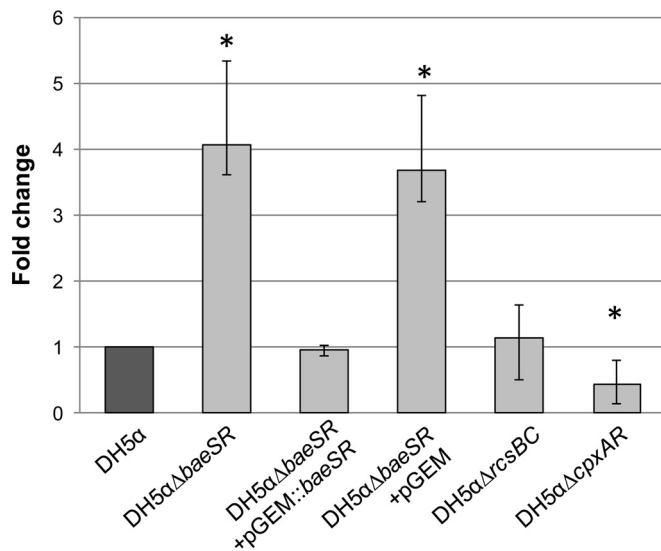
envelope that may be involved in phage attachment to the bacterial surface. BamA (also called YaeT) has been reported to be the receptor for short-tailed Stx phages (21, 22). If BaeSR affects the expression of BamA, this may have affected phage attachment and hence lysogenic conversion, thus providing an explanation for the difference in the numbers of Stx phage lysogens observed between the WT and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*.

To explore this possibility, we determined the expression levels of *bamA* mRNA in the different host strains by RT-qPCR. The results obtained for each strain were normalized by expression of the 16S rRNA genes of all the strains. The relative expression was recorded as fold changes with respect to the WT. The *bamA* gene expression in DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* was 4-fold higher than in the WT (Fig. 6), representing a significant increase ( $P = 0.005$ ). *bamA* expression dropped again to WT levels ( $P = 0.552$ ) when the strain was complemented with intact *baeSR* (Fig. 6). Significant changes ( $P = 0.002$ ) in *bamA* expression were again observed in DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR* containing the pGEM-T Easy plasmid without an insert (Fig. 6). Unlike DH5 $\alpha$  $\Delta$ *baeSR*, the strains containing deletions of the *cpxAR* and *rscBC* pathways showed no increase in *bamA* expression. While no significant ( $P = 0.372$ ) changes in *bamA* expression were observed for the DH5 $\alpha$  $\Delta$ *rscBC* mutant, the levels of expression in the DH5 $\alpha$  $\Delta$ *cpxAR* mutant were significantly ( $P = 0.002$ ) lower than in the WT (Fig. 6).

## DISCUSSION

The role of Stx phages in the pathogenicity of *E. coli* has been widely demonstrated (23, 24). Lysogenization of a susceptible host strain can result in the emergence of new, dangerous strains, as recently occurred in Germany (25, 26). Stx is not the only virulence factor in STEC, but it does seem, in addition to the colonization abilities of a given strain, to play a key role in the successful development of disease.

Signal transduction pathways control the adaptive response to envelope stress in *E. coli* (10) and could influence the virulence phenotypes. We explored in this study how three different enve-



**FIG 6** Relative fold change of *bamA* expression in the mutant strains (light gray) relative to the WT strain (dark gray) using quantitative real-time RT-PCR analysis. Quantification of *bamA* RNA transcripts was performed in triplicate, and the expression of *E. coli* 16S rRNA genes was used as a reference to normalize the results for each strain. The fold change is shown on a logarithmic scale. \*,  $P > 0.01$  (significant differences from the WT). The error bars indicate standard deviations.

lope stress responses in STEC affect Stx phage lysogenization. Among the three pathways examined, only BaeSR enhanced Stx2 phage lysogenic conversion. RcsBC failed to show a clear influence, while the CpxAR mutation showed a slight but significant reduction in the number of lysogens obtained. Based on these results, a deeper exploration of the CpxAR pathway should be conducted in future studies.

The differences observed using the BaeSR mutant strain were not attributable to the fitness cost paid by the bacteria because of the mutation or the incorporation of the phage. We did not observe spontaneous lysis of the lysogens, either, which we attributed to the use of *E. coli* DH5α, which displays a low level of spontaneous induction with Stx phages, as the host (19). Therefore, the number of lysogens was not expected to be reduced by spontaneous activation of the phage lytic pathway. Actually, the BaeSR mutant showed the same level of phage induction as its WT counterparts, confirming that phage lysis could not be the cause of the observed differences. Our observations suggest that the lysogens, once generated, coexist with the nonlysogenic bacterial cells in the culture. The effect, with some variations, appears to be common to all the Stx2 phages studied here. This group of phages show some variability in their sequences (14) but also share common traits.

Some factors, such as indole, sodium tungstate, or zinc (27–29), induce BaeSR response and should cause interference with the acquisition of Stx phages by their potential host strains. For instance, zinc has been reported to inhibit virulence traits in pathogenic *E. coli* and, in particular, Stx phage induction (30). However, assays with indole, zinc, or sodium tungstate were not possible in this study, as various concentrations of these compounds were found to affect the growth of the strains (data not shown). This reduction in the number of cells of the host strains prevented evaluation of the impact of the factors on phage lysogenization.

BaeSR expression is related to drug and metal resistance (31, 32) and to zinc toxicity response (33). Together with CpxAR, it activates *spy*, which encodes a periplasmic chaperone of proteins involved in envelope biogenesis (10, 34). The role of BaeSR in envelope biogenesis could be linked to the up/down regulation of elements of the bacterial surface. Phages recognize and attach to receptors in the bacterial surface to initiate infection (35). Phage receptors are mainly represented by surface proteins, polysaccharides, and lipopolysaccharides (35). Short-tailed Stx phages, like the ones in this study (14), specifically recognize BamA (21, 22). BamA (or YaeT) is a conserved protein essential for outer membrane protein assembly in Gram-negative bacteria (21).

Increased BamA expression in the absence of BaeSR should improve the efficiency of infection by Stx phages and, hence, the frequency of lysogenization. This observation provides an explanation for the greater number of DH5αΔbaeSR lysogens observed in this study. The association between the BaeSR pathway and BamA could be an indirect or a synergistic effect or the consequence of the activation of an integrated and complex response to extracytoplasmic signals (5).

Perez-Rodriguez et al. (12) described the relationship between the BaeSR pathway and the activation of the CRISPR-Cas system. The reduction of lysogens observed in our study could be caused by CRISPR defense mechanisms that are not activated when BaeSR is absent. However, the CRISPR-Cas I-E system appears to be inactive in *E. coli* under normal laboratory growth conditions (36). Additionally, the host needs to acquire the appropriate spacers for recognizing foreign DNA (36). The acquisition of these spacers is not likely to take place very quickly, even under the prolonged incubation times used in this study.

Bacteria have developed mechanisms to avoid adsorption and/or lysogenization by a given phage (37). Pathogenic STEC strains pose a risk to human health, and therefore, identification of the mechanisms for Stx phage acquisition and maintenance, as well as determining the signal pathways activated in the recipient strains, could be a first step to reducing and controlling the emergence of new pathogenic clones.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2009-07576 and AGL2012-30880), the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), and the Centre de Referència en Biotecnologia (XeRBA). A. Martínez-Castillo and L. Imamovic received grants from the Spanish Ministry of Education and Science.

We thank M. C. Rodríguez de Evgrafov for useful comments on the manuscript.

#### REFERENCES

1. Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Brüßow H. 2003. Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* 6:417–424. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00086-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00086-9).
2. Muniesa M, Schmidt H. 2014. Shiga toxin-encoding phages: multifunctional gene ferries, p 57–77. In Morabito S (ed), *Pathogenic Escherichia coli: molecular and cellular microbiology*. Horizon Press, Linton, United Kingdom.
3. Muniesa M, Hammerl J, Hertwig S, Appel B, Brüßow H. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol* 78:4065–4073. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00217-12>.
4. Laing CR, Zhang Y, Gilmour MW, Allen V, Johnson R, Thomas JE, Gannon VPJ. 2012. A comparison of Shiga-toxin 2 bacteriophage from classical enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes and the German *E. coli* O104:H4 outbreak strain. *PLoS One* 7:e37362. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037362>.

5. Bury-Moné S, Nomane Y, Reymond N, Barbet R, Jacquet E, Imbeaud S, Jacq A, Boulloc P. 2009. Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. PLoS Genet 5:e1000651. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000651>.
6. Ruiz N, Silhavy TJ. 2005. Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. Curr Opin Microbiol 8:122–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.013>.
7. Humphreys S, Rowley G, Stevenson A, Anjum MF, Woodward MJ, Gilbert S, Kormanec J, Roberts M. 2004. Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Infect Immun 72:4654–4661. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.8.4654-4661.2004>.
8. Morgan JK, Vendura KW, Stevens SM, Riordan JT. 2013. RcsB determines the locus of enterocyte effacement (LEE) expression and adherence phenotype of *Escherichia coli* O157:H7 spinach outbreak strain TW14359 and coordinates bicarbonate-dependent LEE activation with repression of motility. Microbiology 159:2342–2353. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.070201-0>.
9. Osterhout RE, Figueroa IA, Keasling JD, Arkin AP. 2007. Global analysis of host response to induction of a latent bacteriophage. BMC Microbiol 7:82. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-7-82>.
10. Raffa RG, Raivio TL. 2002. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 45:1599–1611. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03112.x>.
11. Raivio T. 2011. Identifying your enemies—could envelope stress trigger microbial immunity? Mol Microbiol 79:557–561. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07485.x>.
12. Perez-Rodriguez R, Haitjema C, Huang Q, Nam KH, Bernardis S, Ke A, DeLisa MP. 2011. Envelope stress is a trigger of CRISPR RNA-mediated DNA silencing in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 79:584–599. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07482.x>.
13. O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226:694–696. <http://dx.doi.org/10.1126/science.6387911>.
14. Muniesa M, Blanco JE, De Simón M, Serra-Moreno R, Blanch AR, Jofre J. 2004. Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. Microbiology 150:2959–2971. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27188-0>.
15. Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, Jofre J, Muniesa M. 2006. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. BMC Mol Biol 7:31. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-7-31>.
16. Imamovic L, Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M. 2010. Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. J Appl Microbiol 108:1105–1114. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04664.x>.
17. Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc 3:1101–1108. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
18. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 97:6640–6645. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
19. Imamovic L, Muniesa M. 2012. Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. PLoS One 7:e32393. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032393>.
20. Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M. 2007. Insertion site occupancy by stx2 bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. J Bacteriol 189:6645–6654. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00466-07>.
21. Smith DL, James CE, Sergeant MJ, Yaxian Y, Saunders JR, McCarthy AJ, Allison HE. 2007. Short-tailed stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among enterobacteria. J Bacteriol 189:7223–7233. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00824-07>.
22. Islam MR, Ogura Y, Asadulghani M, Ooka T, Murase K, Gotoh Y, Hayashi T. 2012. A sensitive and simple plaque formation method for the Stx2 phage of *Escherichia coli* O157:H7, which does not form plaques in the standard plating procedure. Plasmid 67:227–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.12.001>.
23. Neely MN, Friedman DI. 1998. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of Shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. Mol Microbiol 28:1255–1267. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00890.x>.
24. Zhou Z, Li X, Liu B, Beutin L, Xu J, Ren Y, Feng L, Lan R, Reeves PR, Wang L. 2010. Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor. PLoS One 5:e8700. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008700>.
25. Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Deléré Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Höhle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Lubner P, Rosner B, Stark K, Kühne M. 2011. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. N Engl J Med 365:1763–1770. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1106482>.
26. King LA, Nogareda F, Weill F-X, Mariani-Kurkdjian P, Loukiadis E, Gault G, Jourdan-DaSilva N, Bingen E, Macé M, Thevenot D, Ong N, Castor C, Noël H, Van Cauteren D, Charron M, Vaillant V, Aldabe B, Goulet V, Delmas G, Couturier E, Le Strat Y, Combe C, Delmas Y, Terrier F, Vendrely B, Rolland P, de Valk H. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. Clin Infect Dis 54:1588–1594. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis255>.
27. Leblanc SKD, Oates CW, Raivio TL. 2011. Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. J Bacteriol 193:3367–3375. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01534-10>.
28. Appia-Ayme C, Patrick E, Sullivan MJ, Alston MJ, Field SJ, AbuOun M, Anjum MF, Rowley G. 2011. Novel inducers of the envelope stress response BaeSR in *Salmonella* Typhimurium: BaeR is critically required for tungstate waste disposal. PLoS One 6:e23713. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023713>.
29. Wang D, Ding X, Rather PN. 2001. Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. J Bacteriol 183:4210–4216. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.14.4210-4216.2001>.
30. Crane JK, Byrd IW, Boedeker EC. 2011. Virulence inhibition by zinc in Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 79:1696–1705. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01099-10>.
31. Baranova N, Nikaido H. 2002. The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. J Bacteriol 184:4168–4176. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.15.4168-4176.2002>.
32. Yamamoto K, Ogasawara H, Ishihama A. 2008. Involvement of multiple transcription factors for metal-induced spy gene expression in *Escherichia coli*. J Biotechnol 133:196–200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.002>.
33. Wang D, Fierke CA. 2013. The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. Metallomics 5:372–383. <http://dx.doi.org/10.1039/c3mt20217h>.
34. Rosner JL, Martin RG. 2013. Reduction of cellular stress by TolC-dependent efflux pumps in *Escherichia coli* indicated by BaeSR and CpxARP activation of spy in efflux mutants. J Bacteriol 195:1042–1050. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01996-12>.
35. Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. Nat Rev Microbiol 11:675–687. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3096>.
36. Almendros C, Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Guzmán NM, García-Martínez J. 2014. CRISPR-Cas functional module exchange in *Escherichia coli*. mBio 5:e00767-13. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00767-13>.
37. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol 8:317–327. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2315>.
38. Rose RE. 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. Nucleic Acids Res 16:355. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.1.355>.





## **5. DISCUSIÓN GENERAL**



## DISCUSIÓN GENERAL

Los elementos genéticos móviles (EGMs) tienen la capacidad de transportar el ADN bacteriano y hacer que prácticamente cualquier gen presente en una bacteria pueda ser movilizado a otra (Bushman, 2002). Este fenómeno proporciona a las bacterias una amplia colección de genes a su alcance, mejorando por lo tanto sus posibilidades de evolucionar. Los nuevos genes adquiridos se mantendrán y serán transmitidos a generaciones sucesivas si confieren una ventaja al hospedador, como por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos o genes de virulencia.

El proceso puede llevarse a cabo por contacto físico entre la célula donadora y receptora, mediante la conjugación por plásmidos o, por el contrario, sin contacto físico mediante transformación o transducción mediada por bacteriófagos. Existe abundante bibliografía sobre los plásmidos y fagos como EGMs en la movilización de genes de virulencia (Schmidt *et al.*, 1995; Johnson y Nolan, 2009; Penadés *et al.*, 2015).

No obstante, existen EGMs en los que se observan formas intermedias de estos elementos, así existen fagos que replican como plásmidos (Oliver *et al.*, 2005) o transposones insertos en fagos (Willi *et al.*, 1997) o fagos que se movilizan como un transposon (fago Mu) (Mizuuchi, 1983). Además de estos elementos intermedios, se ha descrito un tipo de EGMs llamados “*gene transfer agents*” (GTA). Los GTA son derivados de fagos capaces de empaquetar e incorporar aparentemente al azar regiones del genoma, de una forma similar a la transducción generalizada mediada por fagos. Sin embargo, a diferencia de la transducción generalizada, no es necesario que la bacteria sea infectada por un fago, sino que los GTA se encuentran distribuidos por todo el cromosoma bacteriano, por lo que se trata de un tipo de EGM disponible en la bacteria para movilizar su ADN (Lang *et al.*, 2012; Guy *et al.*, 2013). Sólo se han descrito GTA en alphaproteobacterias aisladas del océano, (Lang y Beatty, 2007; McDaniel *et al.*, 2010, 2012), pero parte de la metodología usada para detectar material genético transportado por un bacteriófago no permite distinguir la diferencia entre fagos de transducción especializada o generalizada y GTAs, por

lo que podría encontrarse genes movilizados por GTA en diversas especies bacterianas (Brown-Jaque *et al.*, 2015).

En este trabajo nos hemos centrado en estudiar a los bacteriófagos portadores de genes de virulencia como EGM. Para ello se estudió en primera instancia, la presencia de bacteriófagos Stx2 en heces de individuos sanos, dado que los bacteriófagos Stx han sido ampliamente estudiados en nuestro grupo de investigación y trabajos anteriores han demostrado su presencia y capacidad de infección en alimentos aptos para el consumo humano (Imamovic *et al.*, 2009) y en aguas residuales (Muniesa y Jofre 1998; Imamovic *et al.*, 2010). La presencia de fagos Stx en las heces humanas aparece como la conexión entre su prevalencia en los alimentos, que al ser ingeridos incorporan los fagos Stx que son luego excretados en el agua residual

Se estudiaron 100 muestras de heces provenientes de individuos que no presentaban ninguna patología intestinal y a los que no se les había aislado ninguna enterobacteria ni protozoos, rotavirus o adenovirus. Los individuos no habían desarrollado infección por STEC, cosa lógica dada la baja prevalencia de STEC en nuestra área de estudio (Barcelona). La presencia del gen *stx*<sub>2</sub> en el 60% de fracción fágica de las muestras estudiadas, confirma la prevalencia de éstos en nuestro medio ambiente, aunque esta alta prevalencia no pueda ser explicada todavía.

Asumiendo la existencia de fagos Stx libres en el intestino de personas “sanas”, nos preguntamos cómo interaccionan estos fagos con la abundante población bacteriana en el interior del intestino. Nos planteamos que si los fagos Stx detectados son infecciosos, son por tanto capaces de infectar nuevas células bacterianas, por lo que podrían generar nuevas cepas patógenas a nivel intestinal. Hechos similares se cree que fueron los causantes de la aparición de la cepa O104:H4 *stx*<sup>+</sup> causante del brote de Alemania en el 2011 (Bielaszewska *et al.*, 2011).

Los ensayos de infectividad determinaron la capacidad de los fagos Stx de las muestras fecales de propagar en diferentes bacterias huésped. En una de las muestras incluso se pudo observar la presencia de calvas de lisis producida por fagos Stx.

Desafortunadamente, no se obtuvo ningún lisógeno de Stx con estos fagos, probablemente debido a la baja frecuencia de formación de lisógenos de los fagos Stx o a que no se utilizó el huésped adecuado, tal y como se ha observado en otros trabajos (Imamovic y Muniesa 2011).

El número tan bajo de placas de lisis generadas por los fagos Stx de las muestras puede indicarnos que una parte de los positivos observados por qPCR en la extracción fágica de las muestras analizadas no sean bacteriófagos infectivos. Incluso permite especular si algunas de las partículas detectadas no sean fagos Stx clásicos sino partículas derivadas de fagos, como partículas de transducción generalizada o elementos similares a los GTA. La presencia de fagos Stx libres en muestras fecales podría explicar el fenómeno que se da en los centros hospitalarios al detectar el gen *stx* pero no poder aislar ninguna cepa STEC.

Una vez estudiada la presencia de fagos Stx2 libres, nos centramos en estudiar diversos genes de virulencia que se encontraban en cepas STEC y la posibilidad que también se encontraran en fagos. Se usaron cepas STEC aisladas en agua residual de diferentes orígenes de nuestra colección. Si alguno de estos factores fuera movilizado por fagos, esto supondría un riesgo mayor de transferencia de estos genes.

Hay estudios que determinan, que la evolución de las cepas STEC ha sido a partir de ancestros *stx*-negativos y que inicialmente no poseían el resto de genes necesarios para producir la enfermedad (Law, 2000). Tras la incorporación y pérdida de diferentes genes se llegaron a generar serotipos con mayor patogenicidad como la *E. coli* O157:H7. Por lo tanto, nos pareció interesante estudiar cepas STEC medioambientales, no seleccionadas en base a su patogenicidad y estudiar los diferentes genes de virulencia que tuvieran a fin de detectar estadios intermedios en la evolución de estas cepas.

Las cepas STEC se caracterizan porque poseen la toxina Shiga necesaria para producir el SUH, siendo la variante *stx*<sub>2</sub> la más virulenta. Al analizar las 103 cepas STEC, se observó que las variantes *stx*<sub>2a</sub> y *stx*<sub>2c</sub> fueron las predominantes. No sólo se detectó la presencia de los genes *stx* en altas proporciones, sino que algunas cepas que poseían unas de las dos variantes, fueron capaces de producir la toxina Shiga. Estudios previos han demostrado que

algunas cepas que poseen gen *stx* no pueden producir la toxina (Koitabashi *et al.*, 2006). Las variantes *stx*<sub>2</sub> y *stx*<sub>2c</sub> están asociadas con la posibilidad de poder desarrollar una enfermedad grave (Boerlin *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2002), por lo que las cepas que las poseen son potencialmente peligrosas. La prevalencia de cada variante coincidía con la de estudios previos, como la prevalencia de *stx*<sub>2c</sub> en ganado bovino (Beutin *et al.*, 1997) o de *stx*<sub>2e</sub> en ganado porcino (Marques *et al.*, 1987).

A pesar de que el principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga, estas cepas presentan una amplia variedad de factores de virulencia que les permiten colonizar e invadir las células eucariotas, aumentando la capacidad de algunos serotipos de causar enfermedades en humanos (Boerlin *et al.*, 1999; Kaper *et al.*, 2004). Algunos de estos factores se ha descrito que se movilizan de forma independiente a otros genes. Tal es el caso de la toxina CDT, movilizada mediante bacteriófagos (Asakura *et al.*, 2007; Allué-Guardia *et al.*, 2011), o la hemolisina, que se moviliza por plásmidos. Sin embargo, existen otros genes que se movilizan conjuntamente, como es el caso de aquellos codificados dentro de la isla de patogenicidad LEE (Elliott *et al.*, 1998; Kaper *et.*, 2004).

Al observar la distribución de los genes de virulencia según su origen, se observó claramente que las cepas que contenían un mayor número de factores de virulencia eran de origen vacuno, seguidas de las de origen humano. Estos resultados confirman el papel de los rumiantes como principal reservorio de cepas STEC virulentas, que pueden luego ser transmitidas a los humanos. En países como Argentina o EEUU que tienen un elevado consumo de carne de vaca, se produce un elevado número de infecciones por *E. coli* O157:H7 al año (Franz *et al.*, 2014) por el consumo de carne poco cocinada. En muchos de los casos, la contaminación de la carne se debe a un mal sacrificio del animal, en el que los fluidos intestinales entran en contacto con la carne, o a un mal procesamiento de la carne, que entra en contacto con las heces de los animales.

El serotipo O157:H7 fue detectado por primera vez en 1982 como causante de un brote de diarrea con sangre debido al consumo de hamburguesas contaminadas (Riley *et al.*, 1983). Desde entonces es el serotipo causante del mayor número de infecciones de STEC en

el mundo. En países como Nueva Zelanda o Argentina, hay una incidencia aproximada en la población del serotipo O157:H7 de 3.5/100000 y 13.9/100000 respectivamente (Franz *et al.*, 2014). En nuestro estudio, las cepas analizadas del serotipo O157:H7 y O157:H- fueron aquellas que contenían el mayor número de genes de virulencia, y todas eran de origen bovino.

Sólo el 7% de las cepas estudiadas eran LEE-positivas, lo que les hace poseer ciertos genes relacionados con virulencia, como el caso de *eae*. El gen *eae* es una adhesina que lleva a cabo la función de A/E y, junto con el gen *stx*, son los genes que se busca cuando se sospecha que una persona desarrolla una enfermedad causada por STEC. Entre todos los genes estudiados, nuestros resultados mostraron una baja prevalencia de *eae*, *nleA*, *cif* y *cdt*, en concordancia con otros estudios (Slanec *et al.*, 2009).

En general, los genes de virulencia que se detectaron con mayor frecuencia fueron aquellos que no estaban codificados en LEE. El más predominante fue la enterohemolisina, *hlyA*, seguidos por el gen *nleC* y el gen *saa*. El gen *saa* codifica para una adhesina análoga a la codificada por *eae*, y como en estudios anteriores, se constató que nunca se encuentran los dos genes en la misma cepa (Paton *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2003). Por eso se considera que Saa ofrece un mecanismo de adhesión en ausencia de la intimina codificada por *eae*.

Se desarrolló una matriz en la que se comparaban cada gen y las veces que este se encontraba con otro gen en la misma cepa, y a partir de la matriz se realizó una agrupación jerárquica en función de lo cercano o alejado que dos genes se podían encontrar en el medio ambiente. Los resultados mostraron dos agrupaciones en las que se observaba por un lado, genes que se moviliza conjuntamente, como es el caso de *map*, *espF* y *espG*, todos codificados en LEE. Otros efectores no codificados en LEE, (*espJ*, *espM*, *nleB2*, *nleC*, *nleD*, *nleE*, *nleF*, *nleA*, *nleH1* y *tccP*) parece también que se movilizaban conjuntamente con los genes codificados en LEE. Se ha descrito que *nleH1-2*, *nleA* y *nleF* se encuentran codificados en la isla OI-71 (Bugarel *et al.*, 2011), no obstante, en los resultados obtenidos no siempre se encontraron en la misma cepa. Situaciones similares se observaron con los genes LEE, ya que el gen *eae* en alguna cepa no se hallaba asociado a los otros genes codificados en la isla de



patogenicidad LEE. Sin embargo, esto se explica porque las islas de patogenicidad pueden truncarse y perder parte de los genes que codifican (Creuzburg *et al.*, 2011) o ganar otros. Se observaron otras asociaciones de genes codificados en islas de patogenicidad, como *nleB2* (localizado en OI-122) y los genes codificados en LEE, en concordancia con otros trabajos reportados que describen la relación entre *nleB* y la virulencia de cepas EHEC y EPEC LEE-positivas (Bugarel *et al.*, 2011).

Pero la observación que más llamó la atención fue que los genes *saa*, *hlyA*, *stx<sub>1</sub>*, *cdt* y *cif* raramente se encontraban en combinación con otros genes. El gen que codifica para la enterohemolisina, *hlyA* se localiza en el plásmido pO157 (Schmidt *et al.*, 1995). Los genes *cdt*, *stx<sub>1</sub>* y *cif* se pueden movilizar mediante bacteriófagos (Allué-Guardia *et al.*, 2011; Asakura *et al.*, 2007). Esto parece indicar que el grupo de genes que identificamos como “independientes” son aquellos movilizables mediante un EGM, lo que concuerda con el hecho de que su presencia no está ligada a la presencia de otros genes. Sin embargo, cuando nos fijamos en *saa*, existe poca información y la poca disponible indicaba que *saa* está localizado en un megaplásmido pO113 (Paton *et al.*, 2001)

A la vista de los resultados, nos preguntamos si alguno de los genes que habíamos analizado se podría movilizar en fagos, aparte de los ya descritos (*stx*, *cdt*, *nleB* y *nleE*, que se sospecha que se encuentra en el mismo profago (Creuzburg *et al.*, 2011), o *cif* (Loukiadis *et al.*, 2008). Por tanto nos centramos en los genes no descritos en fagos que parecía que se movilizaban de forma independiente y más en concreto en el gen *saa*

A partir de las extracciones de ADN fágico de las 12 cepas positivas para el gen *saa* en nuestra colección, se determinó mediante un protocolo de extracción de ADN fágico que *saa* se podía movilizar envuelto en una cápside proteica. Para poder asegurarnos que no se arrastraba ningún fragmento de ADN que no estuviera envuelto en una cápside, se realizaron controles antes de desencapsidar y se trató las muestras con cloroformo para eliminar cualquier vesícula lipídica que pudiera contener ADN en su interior. Dado que se había descrito el origen plasmídico de este gen, se quería principalmente descartar esto. Inicialmente se sospechó un fago dado que cuando las cepas se podían en contacto con un

agente inductor como la Mitomicina C, el número de copias del gen aumentaba hasta 4 unidades logarítmicas y porque además se observó hibridación positiva con una sonda *saa* de calvas de lisis. Estos resultados nos indican que el gen *saa* puede ser un gen movilizado por un bacteriófago o al menos movilizado por mediante una cápside proteica.

Existe un precedente, el bacteriófago P1, que se caracteriza porque una vez ha introducido su material genético dentro de la bacteria huésped, no lo integra en el ADN bacteriano si no que se circulariza, y se mantiene replica como si fuera un plásmido (Thierauf et al., 2009). Por lo tanto, se puede hipotetizar que, a la vista de los resultados, el gen *saa* podría moverse en un bacteriófago tipo P1.

Las cepas que contenían *saa*, también contienen *stx<sub>2</sub>*, por lo que podría ser que se observaran, como mínimo, dos tipos de bacteriófagos y no se descarta que alguno más. Por ello, se realizaron gradientes de CsCl que permiten purificar virus separando diferentes viriones en función de su densidad. En una de las bandas se detectaron partículas conteniendo ADN con *saa*. Esta banda mostró por microscopía electrónica partículas virales de morfología tipo *Podoviridae*. También se detectaron bandas en las que se detectaba *stx<sub>2</sub>*, que presentaron un bacteriófago tipo *Siphoviridae*. Finalmente la confirmación por proteómica de que la fracción de los fagos tipo *Podoviridae saa+* estaba compuesta por proteínas de la cápside fágica confirma la sospecha de que *saa*, puede ser movilizado por fagos, o por partículas derivadas de fagos. Lamentablemente, no fue posible la obtención de lisógenos, pudiéndose deber a que no se utilizaron las cepas huésped adecuadas, , porque las partículas generadas no eran infectivas, o porque no podían integrarse en cromosoma bacteriano, tal como sucede en ocasiones con los bacteriófagos *stx<sub>2</sub>* (Imamovic y Muniesa 2011).

Asumiendo que el gen *saa* se pudiera movilizar mediante un bacteriófago, deberíamos encontrar evidencias de su presencia en el medio ambiente. Por ello, nos planteamos evaluar la presencia de *saa* en la fracción de ADN fágico de aguas residuales provenientes de diferentes de orígenes. Las extracciones de ADN fágico de muestras de diferente origen, reveló que *saa* se detectaba en la fracción de ADN vírico aislado de aguas

residuales de origen vacuno, aviar y porcino. La literatura indica que *saa* se ha detectado en cepas aisladas de carne de vaca (Brusa *et al.*, 2012).

Se concluye que el gen *saa* se moviliza en el medio ambiente mediante algún fago o alguna partícula fágica derivada. No obstante el hecho de que haya sido descrito anteriormente en un plásmido (Paton *et al.*, 2001), no se hayan conseguido formar lisogenos en ninguna cepa huésped y los altos números observados en las muestras de ambientales, hace que se pueda sospechar de algún otro elemento genético móvil similar, tipo GTA (“gene transfer agents”) o algún elemento intermedio como bacteriófagos portadores de plásmidos.

En este trabajo se ha observado que en los pacientes sanos existen fagos Stx libres con capacidad infectiva, que en las condiciones adecuadas podrían acabar lisogenizando alguna bacteria. Por otro lado, hemos analizado cepas STEC ambientales, algunas con *stx* como único gen de virulencia, mientras que otras contenían hasta 19 de genes de virulencia. Sabemos que se pueden movilizar genes como *cdt* o *saa* por fagos o partículas similares y que estos se pueden encontrar en el medio ambiente. Todos estos resultados nos hizo plantearnos que sería interesante estudiar qué mecanismos en la bacteria receptora, en este caso *E. coli*, favorecen o impiden la formación de lisógenos de estos fagos y su conversión a cepas virulentas.

El primer paso para que una cepa llegue a ser infectada por un fago es la unión de éste a los receptores de membrana de la bacteria, provocando la activación de las respuestas de estrés de membrana. Los 5 sistemas de respuesta de estrés de membrana descritos (Bury-Moné *et al.*, 2009) actúan a partir de señales de fosforilación que provocan la activación de cascadas enzimáticas para responder al estímulo o daño sufrido.

Para este estudio se utilizaron fagos Stx y su capacidad para formar lisogenos sobre *E. coli* y, por lo tanto, contribuir a la formación de nuevas STEC. Para ello se estudiaron las diferentes vías de estrés de membrana y se determinó que la vía BaeSR está implicada en la formación de lisogenos. Se confirmó porque cuando se deleccionaba el gen se producían un aumento significativo en el número de lisogenos. El resto de sistemas no produjeron cambios significativos en la formación de lisógenos al ser deleccionados en las cepas, excepto CpXAR 150

que presento pequeñas disminuciones en la producción de lisógenos. A pesar de que los fagos Stx son un grupo muy heterogéneo (Muniesa *et al.*, 2004), este resultado se observó con distintos fagos Stx.

Los bacteriófagos reconocen y se unen a receptores de la membrana para producir la infección (Samson *et al.*, 2013). Una de estos receptores es BamA, que es una proteína de membrana conservada en las bacterias Gram negativas y usada por los fagos Stx de tipo *Podoviridae* para unirse a la bacteria e infectarla (Smith *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2012). El aumento de la expresión de BamA en ausencia de BaeSR implicaría un aumento de la probabilidad de infección por fagos Stx, y provee por tanto una explicación plausible a nuestros resultados ya que este aumento de probabilidad de infección se correspondería a una mayor frecuencia en la formación de lisógenos.

En conclusión, las cepas bacterianas aumentan su virulencia gracias a la incorporación de diferentes genes, lo que les confiere la capacidad de producir graves problemas para la salud. Genes como el *stx* o *saa*, pueden ser movilizados mediante bacteriófagos y, si encuentran la bacteria huésped adecuada, podrán infectarla e incorporarle el incorporarse al material genético de la bacteria. Por ello es importante conocer los mecanismos que favorecen la conversión fágica.

Dado que la frecuencia de infección y por tanto de conversión lisogénica aumenta proporcionalmente al aumentar el número de fagos y células huésped, también es importante conocer si existe la posibilidad de que los bacteriófagos que poseen genes de virulencia como el *stx*, circulen libremente en el medio ambiente y puedan entrar en contacto con su bacteria huésped.

El medioambiente constituye un bioma donde fagos y bacterias pueden encontrarse. De la misma forma que en el intestino humano la conversión lisogénica juega un papel importante, en ciertos ambientes, como aguas fecalmente contaminadas se puede generar lisógenos. En el caso de STEC el resultado de la posible unión entre fagos Stx libres y *E. coli* en el medio ambiente se ha observado indirectamente el brote ocurrido en Alemania en Mayo del 2011. Del mismo modo, se encuentran circulando cepas STEC en lo que parecen

estados intermedios de una cepa virulenta, que ha adquirido genes de virulencia a través de elementos genéticos móviles.

Del mismo modo descrito para STEC, la presencia de otros genes de virulencia, como *saa*, en este estudio o *cdt* en estudios anteriores (*cdt*) pone de manifiesto la presencia de EGM derivados de fagos circulantes en el medio ambiente. Estos elementos transportan ADN protegido por una cápside proteica pueden ser mejores contribuyentes a la dispersión de estos genes que otros EGMs de ADN desnudo, más susceptible a la degradación por factores ambientales y que por tanto requieren contacto de células directo.

Por último, la descripción de genes virulencia como *saa* que han sido descritos en EGM diferentes a los bacteriófagos, pero que pueden ser movilizados mediante algún tipo de cápside proteica, puede implicar que la presencia de los GTA o elementos similares pueda darse en otra especie bacterianas como *E. coli*. Estas observaciones, de confirmarse, abren nuevas perspectivas porque sugieren que esta movilización no debería ser exclusiva de *saa*, sino que podría ser un mecanismo extensible a otros genes. Se podría considerar como una estrategia utilizada para la diseminación del material genético por parte de las STEC, que explicaría observaciones hechas con los genes *stx*. Por ejemplo que no siempre se corresponde su infectividad con los valores de qPCR, o que todo y que muestran signos de replicación, no replican como lo haría un fago, sino que parecen limitarse a uno o dos ciclos replicativos. Podría especularse que una fracción de los fagos *Stx* detectados por qPCR en el ambiente sean en realidad GTA portadores de *stx*. Agentes con capacidad de salir de la bacteria y de dispersar su herencia genética para aumentar la variabilidad del mundo microbiano.

## **6. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

El estudio desarrollado en esta tesis, ha llevado a cabo la obtención de una serie de resultados, de los cuales se ha obtenido las siguientes conclusiones principales.

- Se ha confirmado la presencia de fagos Stx2 en las heces de personas sanas, por lo que se confirma que este es el origen de los fagos Stx detectados en agua residual en estudios previos. La presencia de estos fagos no está relacionada con la presencia ni la infección con STEC.
- Se ha demostrado que las personas serían el nexo de unión entre la abundancia de fagos Stx en los alimentos y los encontrados en agua residual.
- Los fagos Stx2 encontrados en las heces son infectivos y por lo tanto capaces de transducir el gen *stx<sub>2</sub>* a otras cepas pudiendo generar nuevas cepas STEC. No obstante, podría ser que alguna de las partículas que muestran capacidad infectiva, no sean propiamente fagos Stx, si no que el gen *stx* se encuentra empaquetado en otro tipo de partículas, probablemente de transducción generalizada.
- En el agua residual se ha determinado la presencia de bacterias STEC con abundantes genes de virulencia capaces de producir la toxina Stx. Las variantes de *stx* con mayor capacidad de virulencia, *stx<sub>2</sub>* y *stx<sub>2c</sub>*, han sido detectadas en dichas cepas ambientales, lo que demuestra la presencia en el medio ambiente de estadios intermedios de cepas STEC virulentas potencialmente capaces de producir algún tipo de enfermedad.
- El mayor número de genes de virulencia se encuentra en las cepas de origen bovino. Además el serotipo mayoritario para estas cepas es el O157:H7, y concuerda con el hecho de que el intestino de los rumiantes es un reservorio de cepas STEC virulentas
- Se detectó que el gen que codifica para la enterohemolisina *hlyA* es el mayoritario en las cepas STEC que se encuentran en el medio ambiente. Junto con *stx<sub>1</sub>*, *cdt*, *saa* y *cif* forman un cluster de genes que se movilizan independientemente a otros genes. La prevalencia de los genes de virulencia no muestra relaciones filogenéticas entre cepas, sino que se sugiere una adquisición por elementos genéticos móviles.



- Se ha demostrado que el gen *saa* puede movilizarse de unas cepas a otras mediante un proceso de transferencia horizontal mediada por algún tipo de partícula fágica con morfología *Podoviridae*, probablemente tipo GTA.
- El gen *saa* presenta una inducción espontánea, no obstante, se incrementa su número cuando está en contacto con un inductor clásico del ciclo lítico de bacteriófagos, como la mitomicina C.
- Las partículas fágicas que codifican para *saa* son capaces de infectar a bacterias de laboratorio, como *E. coli* WG5.
- Se ha aislado y cuantificado ADN vírico de muestras ambientales con contaminación de origen humano y animal, con presencia del gen *saa*.
- Se ha terminado que el sistema de membrana BaeSR está implicado en prevenir los procesos de infección y lisogenia de los diferentes fagos Stx2. Las otras vías de membrana estudiadas, RcsBC y CpxAR no se observa que estén implicadas en la prevención de la formación de lisógenos.
- La diferencia en el número de lisógenos observados no se debe a un coste en el fitness celular. En las poblaciones bacterianas coexistirán poblaciones de células lisogénicas y no lisogénicas.
- Se ha determinado que en ausencia de BaeSR se produce un incremento del receptor de membrana más frecuente para los bacteriófagos Stx, BamA (o YaeT), lo que implica un aumento en las infecciones por Stx y la posibilidad de producir más lisógenos. Se concluye que esta es la causa de los resultados observados.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

## - A -

1. **Aertsen, A., Faster, D. & Michiels, C. W. (2005).** Induction of Shiga toxin-converting prophage in *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1155–62.
2. **Allison, H. E. (2007).** Stx-phages: drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiol* **2**, 165–74.
3. **Allué-Guardia, A., García-Aljaro, C. & Muniesa, M. (2011).** Bacteriophage-encoding cytolethal distending toxin type V gene induced from nonclinical *Escherichia coli* isolates. *Infect Immun* **79**, 3262–72.
4. **Allué-Guardia, A., Martínez-Castillo, A. & Muniesa, M. (2014).** Persistence of infectious Shiga toxin-encoding bacteriophages after disinfection treatments. *Appl Environ Microbiol* **80**, 2142–9.
5. **Asadulghani, M., Ogura, Y., Ooka, T., Itoh, T., Sawaguchi, A., Iguchi, A., Nakayama, K. & Hayashi, T. (2009).** The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog* **5**, e1000408.
6. **Asakura, M., Hinenoya, A., Alam, M. S., Shima, K., Zahid, S. H., Shi, L., Sugimoto, N., Ghosh, A. N., Ramamurthy, T. & other authors. (2007b).** An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14483–8.
7. **Authority, E. F. S. (2013).** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA J* **2013** **11**.

## - B -

8. **Baruch, K., Gur-Arie, L., Nadler, C., Koby, S., Yerushalmi, G., Ben-Neriah, Y., Yogev, O., Shaulian, E., Guttman, C. & other authors. (2011).** Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF- $\kappa$ B. *EMBO J* **30**, 221–31.

9. **Bell, C. E., Frescura, P., Hochschild, A. & Lewis, M. (2000).** Crystal structure of the lambda repressor C-terminal domain provides a model for cooperative operator binding. *Cell* **101**, 801–11.
10. **Bern, C. (2004).** Diarrhoeal Diseases. In *Glob Epidemiol Infect Dis*, Vol 4. of., pp. 1–27. Edited by C. J. L. Murray, A. D. Lopez & C. D. Mathers. Geneva: World Health Organization.
11. **Besser, T. E., Shaikh, N., Holt, N. J., Tarr, P. I., Konkel, M. E., Malik-Kale, P., Walsh, C. W., Whittam, T. S. & Bono, J. L. (2007).** Greater diversity of Shiga toxin-encoding bacteriophage insertion sites among *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle than in those from humans. *Appl Environ Microbiol* **73**, 671–9.
12. **Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H. A. & Whittam, T. S. (1997).** Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2175–80.
13. **Beutin, L., Hammerl, J. A., Reetz, J. & Strauch, E. (2014).** Shiga toxin 2A-encoding bacteriophages in enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 strains. *Emerg Infect Dis* **20**, 1567–8.
14. **Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., Aldick, T., Schürk-Bulgrin, R. & Karch, H. (2006).** Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis* **43**, 1160–7.
15. **Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G. & Karch, H. (2011).** Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* **11**, 671–6.
16. **Bilge, S. S., Clausen, C. R., Lau, W. & Moseley, S. L. (1989).** Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J Bacteriol* **171**, 4281–9.
17. **Blanch, A. R., García-Aljaro, C., Muniesa, M. & Jofre, J. (2003).** Detection, enumeration and isolation of strains carrying the *stx2* gene from urban sewage. *Water Sci Technol* **47**, 109–16.

18. **Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Mora, A., Dahbi, G., Coira, M. A. & Blanco, J. (2004).** Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol* **42**, 311–9.
19. **Boerlin, P., McEwen, S. A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J. B., Johnson, R. P. & Gyles, C. L. (1999).** Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* **37**, 497–503.
20. **Bos, M. P., Robert, V. & Tommassen, J. (2007).** Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* **61**, 191–214.
21. **Boyd, E. F. & Brüßow, H. (2002).** Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol* **10**, 521–9.
22. **Brenner, D. J. & Falkow, S. (1971).** Genetics of the Enterobacteriaceae. C. Molecular relationships among members of the Enterobacteriaceae. *Adv Genet* **16**, 81–118.
23. **Brenner, D. J., Krieg, N. R. & Staley, J. R. (2005).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2 Prot. (M. George, Ed.). USA: Springer.
24. **Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W. & Muniesa, M. (2015).** CRE. *Plasmid* **79C**, 1–7.
25. **Brusa, V., Aliverti, V., Aliverti, F., Ortega, E. E., de la Torre, J. H., Linares, L. H., Sanz, M. E., Etcheverría, A. I., Padola, N. L. & other authors. (2012).** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 171.
26. **Brüßow, H., Canchaya, C. & Hardt, W.-D. (2004).** Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 560–602, table of contents.
27. **Brzuszkiewicz, E., Thürmer, A., Schuldtes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F.-D., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G. & Daniel, R. (2011).** Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol* **193**, 883–91.

28. **Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M. M., Remschmidt, C., Wilking, H., Deleré, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C. & other authors. (2011).** German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med* **365**, 1763–70.
29. **Bugarel, M., Martin, A., Fach, P. & Beutin, L. (2011).** Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiol* **11**, 142.
30. **Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A. & Bouloc, P. (2009).** Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **5**, e1000651.
31. **Bushman, F. (2002).** *Lateral DNA Transfer: Mechanisms and Consequences*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- C -

32. **Calderwood, S. B., Auclair, F., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G. T. & Mekalanos, J. J. (1987).** Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4364–8.
33. **Campbell, A. (1994).** Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annu Rev Microbiol* **48**, 193–222.
34. **Campbell, A. (2003).** The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet* **4**, 471–7.
35. **Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L. & Brüssow, H. (2003).** Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* **6**, 417–24.
36. **Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H. & Oswald, E. (2005)** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* **36**, 289–311.
37. **Celli, J., Deng, W. & Finlay, B. B. (2000).** Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol* **2**, 1–9.

38. **Chagnot, C., Caccia, N., Loukiadis, E., Ganet, S., Durand, A., Bertin, Y., Talon, R., Astruc, T. & Desvaux, M. (2014).** Colonization of the meat extracellular matrix proteins by O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **188**, 92–8.
39. **Coombes, B. K., Wickham, M. E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B. B. & Karmali, M. A. (2008).** Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2153–60.
40. **Court, D. & Oppenheim, A. B. (1983).** Phage Lambda's Accessory Genes. In *Lambda II*, pp. 251–177. Edited by R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Sthal & R. W. Weisberg. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
41. **Court, D. L., Oppenheim, A. B. & Adhya, S. L. (2007).** A new look at bacteriophage lambda genetic networks. *J Bacteriol* **189**, 298–304.
42. **Cray, W. C. & Moon, H. W. (1995).** Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1586–90.
43. **Creuzburg, K., Recktenwald, J., Kuhle, V., Herold, S., Hensel, M. & Schmidt, H. (2005a).** The Shiga toxin 1-converting bacteriophage BP-4795 encodes an NleA-like type III effector protein. *J Bacteriol* **187**, 8494–8.
44. **Creuzburg, K., Köhler, B., Hempel, H., Schreier, P., Jacobs, E. & Schmidt, H. (2005b).** Genetic structure and chromosomal integration site of the cryptic prophage CP-1639 encoding Shiga toxin 1. *Microbiology* **151**, 941–50.
45. **Creuzburg, K., Middendorf, B., Mellmann, A., Martaler, T., Holz, C., Fruth, A., Karch, H. & Schmidt, H. (2011).** Evolutionary analysis and distribution of type III effector genes in pathogenic *Escherichia coli* from human, animal and food sources. *Environ Microbiol* **13**, 439–52.
46. **Croxen, M. A. & Finlay, B. B. (2010).** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**, 26–38.
47. **Czczulin, J. R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M. H., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. (1997).** Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**, 4135–45.



- D -

48. **Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R. M. & Hartland, E. L. (2002).** Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**, 6761–9.
49. **Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Jacobs, E. & Röske, I. (2006).** Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. *Lett Appl Microbiol* **42**, 48–53.
50. **Dundas, S., Todd, W. T., Stewart, A. I., Murdoch, P. S., Chaudhuri, A. K. & Hutchinson, S. J. (2001).** The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* **33**, 923–31.

- E -

51. **Echtenkamp, F., Deng, W., Wickham, M. E., Vazquez, A., Puente, J. L., Thanabalasuriar, A., Gruenheid, S., Finlay, B. B. & Hardwidge, P. R. (2008).** Characterization of the NleF effector protein from attaching and effacing bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **281**, 98–107.
52. **Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E. & Relman, D. A. (2005).** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635–8.
53. **Elliott, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y. K., Lai, L. C., McNamara, B. P., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1998).** The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**, 1–4.
54. **Erdem, A. L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J. & Girón, J. A. (2007).** Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 7426–35.

55. **Erickson, M. C. & Doyle, M. P. (2007).** Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Food Prot* **70**, 2426–49.
56. **Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., Bui, H., Le Bouguéneq, C. & Denamur, E. (2004).** A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **21**, 1085–94.

- F -

57. **Farfan, M. J. & Torres, A. G. (2012).** Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **80**, 903–13.
58. **Frank, C., Faber, M. S., Askar, M., Bernard, H., Fruth, A., Gilsdorf, A., Hohle, M., Karch, H., Krause, G. & other authors. (2011).** Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. *Euro Surveill* **16**.
59. **Franz, E., Delaquis, P., Morabito, S., Beutin, L., Gobijs, K., Rasko, D. A., Bono, J., French, N., Osek, J. & other authors. (2014).** Exploiting the explosion of information associated with whole genome sequencing to tackle Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in global food production systems. *Int J Food Microbiol* **187**, 57–72.
60. **Fraser, M. E., Fujinaga, M., Cherney, M. M., Melton-Celsa, A. R., Twiddy, E. M., O'Brien, A. D. & James, M. N. G. (2004).** Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **279**, 27511–7.
61. **Freeman, V. J. (1951).** Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* **61**, 675–88.
62. **Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W.-L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A. & Karch, H. (2002).** *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**, 74–84.
63. **Frost, L. S., Lepplae, R., Summers, A. O. & Toussaint, A. (2005).** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**, 722–32. Nature Publishing Group.

- G -

64. **García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J. & Blanch, A. R. (2005).** Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol Lett* **246**, 55–65.
65. **Garmendia, J., Phillips, A. D., Carlier, M.-F., Chong, Y., Schüller, S., Marches, O., Dahan, S., Oswald, E., Shaw, R. K. & other authors. (2004).** TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* **6**, 1167–83.
66. **Garmendia, J., Frankel, G. & Crepin, V. F. (2005).** Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**, 2573–85.
67. **Grabow, W. (1995).** *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages: excretion by humans and animals. *Water Sci Technol* **31**, 223–230.
68. **Grif, K., Dierich, M. P., Karch, H. & Allerberger, F. (1998).** Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**, 761–6.
69. **Guy, L., Nystedt, B., Toft, C., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Berglund, E. C., Granberg, F., Näslund, K., Eriksson, A.-S. & Andersson, S. G. E. (2013).** A gene transfer agent and a dynamic repertoire of secretion systems hold the keys to the explosive radiation of the emerging pathogen *Bartonella*. *PLoS Genet* **9**, e1003393.

- H -

70. **Hendrix, R. W., Lawrence, J. G., Hatfull, G. F. & Casjens, S. (2000).** The origins and ongoing evolution of viruses. *Trends Microbiol* **8**, 504–8.
71. **Hinnebusch, J. & Tilly, K. (1993).** Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol Microbiol* **10**, 917–22.

72. **Hughes, A. K. (2002).** Molecular Basis for High Renal Cell Sensitivity to the Cytotoxic Effects of Shigatoxin-1: Upregulation of Globotriaosylceramide Expression. *J Am Soc Nephrol* **13**, 2239–2245.
73. **Humphreys, S., Rowley, G., Stevenson, A., Anjum, M. F., Woodward, M. J., Gilbert, S., Kormanec, J. & Roberts, M. (2004).** Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect Immun* **72**, 4654–61.

- I -

74. **Imamovic, L. & Muniesa, M. (2011).** Quantification and evaluation of infectivity of shiga toxin-encoding bacteriophages in beef and salad. *Appl Environ Microbiol* **77**, 3536–40.
75. **Imamovic, L. & Muniesa, M. (2012).** Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS One* **7**, e32393.
76. **Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R. & Muniesa, M. (2009).** Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1764–8.
77. **Imamovic, L., Ballesté, E., Jofre, J. & Muniesa, M. (2010).** Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5693–701.
78. **Islam, M. R., Ogura, Y., Asadulghani, M., Ooka, T., Murase, K., Gotoh, Y. & Hayashi, T. (2012).** A sensitive and simple plaque formation method for the Stx2 phage of *Escherichia coli* O157:H7, which does not form plaques in the standard plating procedure. *Plasmid* **67**, 227–35.

- J -

79. **Jarvis, W. R. & Martone, W. J. (1992).** Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* **29 Suppl A**, 19–24.
80. **Jenkins, C., Perry, N. T., Cheasty, T., Shaw, D. J., Frankel, G., Dougan, G., Gunn, G. J., Smith, H. R., Paton, A. W. & Paton, J. C. (2003).** Distribution of the *saa* gene in strains of

- Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J Clin Microbiol* **41**, 1775–8.
81. **Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D. & Kaper, J. B. (1990)**. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7839–43.
82. **Johannes, L. & Römer, W. (2010)**. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* **8**, 105–16.
83. **Johansen, B. K., Wasteson, Y., Granum, P. E. & Brynestad, S. (2001)**. Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. *Microbiology* **147**, 1929–36.
84. **Johnson, T. J. & Nolan, L. K. (2009)**. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 750–74.

- K -

85. **Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. (2004b)**. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123–40.
86. **Karch, H., Schmidt, H., Janetzki-Mittmann, C., Scheef, J. & Kröger, M. (1999)**. Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages. *Mol Gen Genet* **262**, 600–7.
87. **Karch, H., Tarr, P. I. & Bielaszewska, M. (2005)**. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* **295**, 405–18.
88. **Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K. & Kaper, J. B. (2003)**. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* **41**, 4930–40.
89. **Kim, J., Thanabalasuriar, A., Chaworth-Musters, T., Fromme, J. C., Frey, E. A., Lario, P. I., Metalnikov, P., Rizg, K., Thomas, N. A. & other authors. (2007)**. The bacterial

- virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. *Cell Host Microbe* **2**, 160–71.
90. **Kimmit, P. T., Harwood, C. R. & Barer, M. R. (2000)**. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis* **6**, 458–65.
91. **King, L. A., Nogareda, F., Weill, F.-X., Mariani-Kurkdjian, P., Loukiadis, E., Gault, G., Jourdan-DaSilva, N., Bingen, E., Macé, M. & other authors. (2012)**. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. *Clin Infect Dis* **54**, 1588–94.
92. **Koitabashi, T., Vuddhakul, V., Radu, S., Morigaki, T., Asai, N., Nakaguchi, Y. & Nishibuchi, M. (2006)**. Genetic characterization of *Escherichia coli* O157: H7/- strains carrying the stx2 gene but not producing Shiga toxin 2. *Microbiol Immunol* **50**, 135–48.
93. **Konczy, P., Ziebell, K., Mascarenhas, M., Choi, A., Michaud, C., Kropinski, A. M., Whittam, T. S., Wickham, M., Finlay, B. & Karmali, M. A. (2008)**. Genomic O island 122, locus for enterocyte effacement, and the evolution of virulent verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**, 5832–40.
94. **Konowalchuk, J. I. S. S. S. (1977, December 1)**. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. American Society for Microbiology (ASM).
95. **Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D. & Rehrauer, W. M. (1994)**. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**, 401–65.
96. **Kulkarni, H., Goldwater, P. N., Martin, A. & Bettelheim, K. A. (2002)**. *Escherichia coli* 'O' group serological responses and clinical correlations in epidemic HUS patients. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **25**, 249–68.
- L -
97. **L'Abée-Lund, T. M., Jørgensen, H. J., O'Sullivan, K., Bohlin, J., Ligård, G., Granum, P. E. & Lindbäck, T. (2012)**. The highly virulent 2006 Norwegian EHEC O103:H25 outbreak strain is related to the 2011 German O104:H4 outbreak strain. *PLoS One* **7**, e31413.

98. **Laing, C. R., Zhang, Y., Gilmour, M. W., Allen, V., Johnson, R., Thomas, J. E. & Gannon, V. P. J. (2012a).** A comparison of Shiga-toxin 2 bacteriophage from classical enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes and the German *E. coli* O104:H4 outbreak strain. *PLoS One* **7**, e37362.
99. **Laing, C. R., Zhang, Y., Gilmour, M. W., Allen, V., Johnson, R., Thomas, J. E. & Gannon, V. P. J. (2012b).** A comparison of Shiga-Toxin 2 bacteriophage from classical enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes and the German *E. coli* O104:H4 outbreak strain. *PLoS One* **7**.
100. **Lanata, C., Walter, M. & BR, E. (2002).** Improving diarrhoea estimates. *WHO* **48**.
101. **Lang, A. S. & Beatty, J. T. (2001).** The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus* and 'constitutive transduction' in prokaryotes. *Arch Microbiol* **175**, 241–249.
102. **Lang, A. S. & Beatty, J. T. (2007).** Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **15**, 54–62.
103. **Lang, A. S., Zhaxybayeva, O. & Beatty, J. T. (2012).** Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol* **10**, 472–82.
104. **Law, D. (2000).** The history and evolution of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *World J Microbiol Biotechnol* **16**, 701–709. Kluwer Academic Publishers.
105. **Leung, P. H. M., Peiris, J. S. M., Ng, W. W. S., Robins-Browne, R. M., Bettelheim, K. A. & Yam, W. C. (2003).** A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7549–53.
106. **Leyton, D. L., Sloan, J., Hill, R. E., Doughty, S. & Hartland, E. L. (2003).** Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. *Infect Immun* **71**, 6307–19.
107. **Little, J. W. (1984).** Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1375–9.
108. **Loukiadis, E., Nobe, R., Herold, S., Tramuta, C., Ogura, Y., Ooka, T., Morabito, S., K  rour  dan, M., Brugère, H. & other authors. (2008).** Distribution, functional expression, and genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**, 275–85.

109. **Lucchesi, P. M. A., Krüger, A. & Parma, A. E. (2006).** Distribution of saa gene variants in verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and food. *Res Microbiol* **157**, 263–6.

- M -

110. **Majdalani, N. & Gottesman, S. (2005).** The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* **59**, 379–405.
111. **Marchès, O., Covarelli, V., Dahan, S., Cougoule, C., Bhatta, P., Frankel, G. & Caron, E. (2008).** EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cell Microbiol* **10**, 1104–15.
112. **Marchès, O., Ledger, T. N., Boury, M., Ohara, M., Tu, X., Goffaux, F., Mainil, J., Rosenshine, I., Sugai, M. & other authors. (2003).** Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol Microbiol* **50**, 1553–67.
113. **Marques, L. R. M., Peiris, J. S. M., Cryz, S. J. & O'Brien, A. D. (1987).** *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol Lett* **44**, 33–38.
114. **Martínez-Castillo, A., Allué-Guardia, A., Dahbi, G., Blanco, J., Creuzburg, K., Schmidt, H. & Muniesa, M. (2012).** Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater. *Environ Microbiol Rep* **4**, 147–55.
115. **Mathusa, E. C., Chen, Y., Enache, E. & Hontz, L. (2010).** Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *J Food Prot* **73**, 1721–36.
116. **McDaniel, L. D., Young, E., Delaney, J., Ruhnau, F., Ritchie, K. B. & Paul, J. H. (2010).** High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science* **330**, 50.
117. **McDaniel, L. D., Young, E. C., Ritchie, K. B. & Paul, J. H. (2012).** Environmental factors influencing gene transfer agent (GTA) mediated transduction in the subtropical ocean. *PLoS One* **7**, e43506.



118. **McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1995).** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1664–8.
119. **Miller, R. V. (2004).** Bacteriophage-mediated transduction: an engine for change for change and evolution. *Mill RV Day MJ Microb Evol gene Establ Surviv Exch* 144–156. Washinton DC.
120. **Mizuuchi K. 1983.** In vitro transposition of bacteriophage Mu: A biochemical approach to a novel replication reaction. *Cell* **35**:785–794.
121. **Morgan, J. K., Vendura, K. W., Stevens, S. M. & Riordan, J. T. (2013).** RcsB determines the locus of enterocyte effacement (LEE) expression and adherence phenotype of Escherichia coli O157: H7 spinach outbreak strain TW14359 and coordinates bicarbonate-dependent LEE activation with repression of motility. *Microbiology* **159**, 2342–53.
122. **Mühldorfer, I., Hacker, J., Keusch, G. T., Acheson, D. W., Tschäpe, H., Kane, A. V, Ritter, A., Olschläger, T. & Donohue-Rolfe, A. (1996).** Regulation of the Shiga-like toxin II operon in Escherichia coli. *Infect Immun* **64**, 495–502.
123. **Muniesa, M. & Jofre, J. (1998).** Abundance in sewage of bacteriophages that infect Escherichia coli O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2443–8.
124. **Muniesa, M. & Jofre, J. (2000).** Occurrence of phages infecting Escherichia coli O157:H7 carrying the Stx 2 gene in sewage from different countries. *FEMS Microbiol Lett* **183**, 197–200.
125. **Muniesa, M., Lucena, F. & Jofre, J. (1999).** Comparative survival of free shiga toxin 2-encoding phages and Escherichia coli strains outside the gut. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5615–8.
126. **Muniesa, M., Serra-Moreno, R. & Jofre, J. (2004a).** Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the stx genes appeared conserved. *Environ Microbiol* **6**, 716–25.

127. **Muniesa, M., Blanco, J. E., De Simón, M., Serra-Moreno, R., Blanch, A. R. & Jofre, J. (2004b).** Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* **150**, 2959–71.
128. **Muniesa, M., Schembri, M. A., Hauf, N. & Chakraborty, T. (2006).** Active genetic elements present in the locus of enterocyte effacement in *Escherichia coli* O26 and their role in mobility. *Infect Immun* **74**, 4190–9.
129. **Muniesa, M., Hammerl, J. A., Hertwig, S., Appel, B. & Brüssow, H. (2012).** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol* **78**, 4065–73.

- N -

130. **Nakajima, H., Kiyokawa, N., Katagiri, Y. U., Taguchi, T., Suzuki, T., Sekino, T., Mimori, K., Ebata, T., Saito, M. & other authors. (2001).** Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **276**, 42915–22.
131. **Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142–201.
132. **Neely, M. N. & Friedman, D. I. (1998).** Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol* **28**, 1255–67.
133. **Newland, J. W., Strockbine, N. A., Miller, S. F., O'Brien, A. D. & Holmes, R. K. (1985).** Cloning of Shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of *Escherichia coli*. *Science* **230**, 179–81.
134. **Newton, H. J., Sloan, J., Bulach, D. M., Seemann, T., Allison, C. C., Tauschek, M., Robins-Browne, R. M., Paton, J. C., Whittam, T. S. & other authors. (2009).** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. *Emerg Infect Dis* **15**, 372–80.
135. **Newton, H. J., Pearson, J. S., Badea, L., Kelly, M., Lucas, M., Holloway, G., Wagstaff, K. M., Dunstone, M. A., Sloan, J. & other authors. (2010).** The type III effectors NleE and

NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF-kappaB p65. *PLoS Pathog* **6**, e1000898.

136. **Nishino, K., Nikaido, E. & Yamaguchi, A. (2007)**. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **189**, 9066–75.
137. **Nougayrède, J.-P., Taieb, F., De Rycke, J. & Oswald, E. (2005)**. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol* **13**, 103–10.
138. **Nübling, S., Eisele, T., Stöber, H., Funk, J., Polzin, S., Fischer, L. & Schmidt, H. (2014)**. Bacteriophage 933W encodes a functional esterase downstream of the Shiga toxin 2a operon. *Int J Med Microbiol* **304**, 269–74.

- O -

139. **O'Brien, A., Newland, J., Miller, S., Holmes, R., Smith, H. & Formal, S. (1984)**. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science (80- )* **226**, 694–696.
140. **O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, F. S. (1982)**. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis*.
141. **O'Loughlin, E. V & Robins-Browne, R. M. (2001)**. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect* **3**, 493–507.
142. **Ochoa, T. J. & Contreras, C. A. (2011)**. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr Opin Infect Dis* **24**, 478–83.
143. **Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani, Terajima, J., Nougayrède, J.-P., Kurokawa, K., Tashiro, K., Tobe, T., Nakayama, K. & other authors. (2007)**. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol* **8**, R138.
144. **Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K. & other authors. (2009)**. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17939–44.

145. **Oliver, A., Coque, T. M., Alonso, D., Valverde, A., Baquero, F. & Cantón, R. (2005).** CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1567–71.
146. **Orden, J. A., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Cid, D., García, S. & de la Fuente, R. (1999).** Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Vet Microbiol* **66**, 265–73.
147. **Orden, J. A., Domínguez-Bernal, G., Martínez-Pulgarín, S., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Blanco, J. & de la Fuente, R. (2007).** Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. *Int Microbiol* **10**, 47–55.

- P -

148. **Pacheco, A. R. & Sperandio, V. (2009).** Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr Opin Microbiol* **12**, 192–8.
149. **Paton, A. W., Woodrow, M. C., Doyle, R. M., Lanser, J. A. & Paton, J. C. (1999).** Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **37**, 3357–61.
150. **Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C. & Paton, J. C. (2001).** Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **69**, 6999–7009.
151. **Paton, A. W. & Paton, J. C. (2002).** Reactivity of convalescent-phase hemolytic-uremic syndrome patient sera with the megaplasmid-encoded TagA protein of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157. *J Clin Microbiol* **40**, 1395–9.
152. **Paton, J. C. & Paton, A. W. (1998).** Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**, 450–79.

153. **Pearson, J. S., Riedmaier, P., Marchès, O., Frankel, G. & Hartland, E. L. (2011).** A type III effector protease NleC from enteropathogenic *Escherichia coli* targets NF- $\kappa$ B for degradation. *Mol Microbiol* **80**, 219–30.
154. **Penadés, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N. & Novick, R. P. (2015, February 1).** Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr Opin Microbiol*. Elsevier.
155. **Perez-Rodriguez, R., Haitjema, C., Huang, Q., Nam, K. H., Bernardis, S., Ke, A. & DeLisa, M. P. (2011).** Envelope stress is a trigger of CRISPR RNA-mediated DNA silencing in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **79**, 584–99.
156. **Persson, S., Olsen, K. E. P., Ethelberg, S. & Scheutz, F. (2007).** Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol* **45**, 2020–4.
157. **Plunkett, G., Rose, D. J., Durfee, T. J. & Blattner, F. R. (1999).** Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J Bacteriol* **181**, 1767–78.
158. **Prager, R., Fruth, A., Busch, U. & Tietze, E. (2011).** Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *Int J Med Microbiol* **301**, 181–91.
159. **Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2004).** *Microbiología*, 5th edn. (McGraw-Hill/Interamericana, Ed.).

- R -

160. **Raffa, R. G. & Raivio, T. L. (2002).** A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**, 1599–611.
161. **Raivio, T. (2011).** Identifying your enemies--could envelope stress trigger microbial immunity? *Mol Microbiol* **79**, 557–61.
162. **Raivio, T. L. (2005).** Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* **56**, 1119–28.

163. **Range, J. M. P. H. S. C. C. P. M. G. and D. L. S. (2005).** Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg Infect Dis J - CDC* **11**.
164. **Recktenwald, J. & Schmidt, H. (2002).** The nucleotide sequence of Shiga toxin (Stx) 2e-encoding phage phiP27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. *Infect Immun* **70**, 1896–908.
165. **Renter, D. G., Morris, J. G., Sargeant, J. M., Hungerford, L. L., Berezowski, J., Ngo, T., Williams, K. & Acheson, D. W. K. (2005).** Prevalence, risk factors, O serogroups, and virulence profiles of Shiga toxin-producing bacteria from cattle production environments. *J Food Prot* **68**, 1556–65.
166. **Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M. & other authors. (1983).** Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *N Engl J Med* **308**, 681–5.
167. **Robert Koch Institut. (2011).** *Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 Outbreak Germany 2011.*
168. **Rooks, D. J., Yan, Y., McDonald, J. E., Woodward, M. J., McCarthy, A. J. & Allison, H. E. (2010).** Development and validation of a qPCR-based method for quantifying Shiga toxin-encoding and other lambdoid bacteriophages. *Environ Microbiol* **12**, 1194–204.
169. **Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J. & Roberts, M. (2006).** Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**, 383–94.
170. **Ruiz, N. & Silhavy, T. J. (2005).** Sensing external stress: watchdogs of the Escherichia coli cell envelope. *Curr Opin Microbiol* **8**, 122–6.
171. **Ruiz, N., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2006).** Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **4**, 57–66.
172. **Russo, T. A. & Johnson, J. R. (2000).** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. *J Infect Dis* **181**, 1753–4.
173. **De Rycke, J., González, E. A., Blanco, J., Oswald, E., Blanco, M. & Boivin, R. (1990).** Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of Escherichia coli. *J Clin Microbiol* **28**, 694–9.

174. **Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M. & Moineau, S. (2013).** Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol* **11**, 675–87.
175. **Sanders, W. J. & Sanders, C. (1997).** Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* **10**, 220–241.
176. **Sansonetti, P. (2002).** Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* **50 Suppl 3**, III2–8.
177. **Scaletsky, I. C. A., Fabbriotti, S. H., Carvalho, R. L. B., Nunes, C. R., Maranhão, H. S., Morais, M. B. & Fagundes-Neto, U. (2002).** Diffusely adherent Escherichia coli as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol* **40**, 645–8.
178. **Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R. & other authors. (2012).** Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* **50**, 2951–63.
179. **Schmidt, H., Beutin, L. & Karch, H. (1995).** Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**, 1055–61.
180. **Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L. H. & Karch, H. (2000).** A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from Escherichia coli isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1205–8.
181. **Schmidt, M. A. (2010).** LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol* **12**, 1544–52.
182. **Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J. P., Jofre, J. & Muniesa, M. (2006).** Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Mol Biol* **7**, 31.
183. **Serra-Moreno, R., Jofre, J. & Muniesa, M. (2007).** Insertion site occupancy by stx2 bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J Bacteriol* **189**, 6645–54.

184. **Servin, A. L. (2005).** Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **18**, 264–92.
185. **Shaikh, N. & Tarr, P. I. (2003).** *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J Bacteriol* **185**, 3596–605.
186. **Simovitch, M., Sason, H., Cohen, S., Zahavi, E. E., Melamed-Book, N., Weiss, A., Aroeti, B. & Rosenshine, I. (2010).** EspM inhibits pedestal formation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* and disrupts the architecture of a polarized epithelial monolayer. *Cell Microbiol* **12**, 489–505.
187. **Slanec, T., Fruth, A., Creuzburg, K. & Schmidt, H. (2009).** Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 6187–97.
188. **Smith, D. L., James, C. E., Sergeant, M. J., Yaxian, Y., Saunders, J. R., McCarthy, A. J. & Allison, H. E. (2007).** Short-tailed stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among enterobacteria. *J Bacteriol* **189**, 7223–33.
189. **Smith, J. L. & Bayles, D. O. (2006).** The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* **32**, 227–48.
190. **Srimanote, P., Paton, A. W. & Paton, J. C. (2002).** Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **70**, 3094–100.
191. **Stearns-Kurosawa, D. J., Collins, V., Freeman, S., Tesh, V. L. & Kurosawa, S. (2010).** Distinct physiologic and inflammatory responses elicited in baboons after challenge with Shiga toxin type 1 or 2 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **78**, 2497–504.



- T -

192. **Tanji, Y., Mizoguchi, K., Akitsu, T., Morita, M., Hori, K. & Unno, H. (2002).** Fate of coliphage in waste water treatment process and detection of phages carrying the Shiga toxin type 2 gene. *Water Sci Technol* **46**, 285–9.
193. **Tarr, P. I., Gordon, C. A. & Chandler, W. L. (2005).** Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **365**, 1073–86.
194. **Tesh, V. L. (2010).** Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol* **5**, 431–53.
195. **Tobe, T., Beatson, S. A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O. & other authors. (2006).** An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14941–6.
196. **Toma, C., Nakasone, N., Miliwebsky, E., Higa, N., Rivas, M. & Suzuki, T. (2008).** Differential adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring saa to epithelial cells. *Int J Med Microbiol* **298**, 571–8.
197. **Tree, J. J., Wolfson, E. B., Wang, D., Roe, A. J. & Gally, D. L. (2009).** Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **17**, 361–70.
198. **Trofa, A. F., Ueno-Olsen, H., Oiwa, R. & Yoshikawa, M. (1999).** Dr. Kiyoshi Shiga: Discoverer of the Dysentery Bacillus. *Clin Infect Dis* **29**, 1303–1306.
199. **Tyler, J. S., Mills, M. J. & Friedman, D. I. (2004).** The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J Bacteriol* **186**, 7670–9.

- U -

200. **USDA-FSIS. (2011).** *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in certain raw beef products.* *Fed Regist.*

## - V -

201. **Velarde, J. J., Varney, K. M., Inman, K. G., Farfan, M., Dudley, E., Fletcher, J., Weber, D. J. & Nataro, J. P. (2007).** Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **66**, 1123–35.
202. **Vlisidou, I., Marchés, O., Dziva, F., Mundy, R., Frankel, G. & Stevens, M. P. (2006).** Identification and characterization of EspK, a type III secreted effector protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* **263**, 32–40.

## - W -

203. **Wagner, P. L., Acheson, D. W. & Waldor, M. K. (2001).** Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**, 1934–7.
204. **Wagner, P. L. & Waldor, M. K. (2002).** Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun* **70**, 3985–93.
205. **Wang, D. & Fierke, C. A. (2013).** The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. *Metallomics* **5**, 372–83.
206. **Wang, G., Clark, C. G. & Rodgers, F. G. (2002).** Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **40**, 3613–9.
207. **Wang, H., Paton, J. C. & Paton, A. W. (2007).** Pathologic changes in mice induced by subtilase cytotoxin, a potent new *Escherichia coli* AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum. *J Infect Dis* **196**, 1093–101.
208. **Watarai, M., Sato, T., Kobayashi, M., Shimizu, T., Yamasaki, S., Tobe, T., Sasakawa, C. & Takeda, Y. (1998).** Identification and characterization of a newly isolated shiga toxin 2-converting phage from shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**, 4100–7.
209. **Weinbauer, M. G. (2004).** Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 127–81.

210. **Wester, A. L., Brandal, L. T. & Dahle, U. R. (2013).** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* carrying the Shiga Toxin gene *stx2*. *J Clin Microbiol* **51**, 4279–80.
211. **Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. (1998).** Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 6578–6583.
212. **Willi, K., Sandmeier, H., Kulik, E. M. & Meyer, J. (1997).** Transduction of antibiotic resistance markers among *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains by temperate bacteriophages  $\lambda$  phi 23. *Cell Mol Life Sci* **53**, 904–10.
213. **Willshaw, G. A., Thirlwell, J., Jones, A. P., Parry, S., Salmon, R. L. & Hickey, M. (1994).** Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Lett Appl Microbiol* **19**, 304–7.
214. **Wu, B., Skarina, T., Yee, A., Jobin, M.-C., Dileo, R., Semesi, A., Fares, C., Lemak, A., Coombes, B. K. & other authors. (2010a).** NleG Type 3 effectors from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* are U-Box E3 ubiquitin ligases. *PLoS Pathog* **6**, e1000960.
215. **Wu, Y., Hinenoya, A., Taguchi, T., Nagita, A., Shima, K., Tsukamoto, T., Sugimoto, N., Asakura, M. & Yamasaki, S. (2010b).** Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan. *J Vet Med Sci* **72**, 589–97.

- Y -

216. **Yahiro, K., Satoh, M., Morinaga, N., Tsutsuki, H., Ogura, K., Nagasawa, S., Nomura, F., Moss, J. & Noda, M. (2011).** Identification of subtilase cytotoxin (SubAB) receptors whose signaling, in association with SubAB-induced BiP cleavage, is responsible for apoptosis in HeLa cells. *Infect Immun* **79**, 617–27.
217. **Yamamoto, K., Ogasawara, H. & Ishihama, A. (2008).** Involvement of multiple transcription factors for metal-induced *spy* gene expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **133**, 196–200.

218. Yamamoto, T., Kojio, S., Taneike, I., Nakagawa, S., Iwakura, N. & Wakisaka-Saito, N. (2003). 60Co irradiation of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* induces Stx phage. *FEMS Microbiol Lett* **222**, 115–21.
219. Yan, Y., Shi, Y., Cao, D., Meng, X., Xia, L. & Sun, J. (2011). Prevalence of Stx phages in environments of a pig farm and lysogenic infection of the field *E. coli* O157 isolates with a recombinant converting Phage. *Curr Microbiol* **62**, 458–64.
- Z -
220. Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Run, J.-Q., Wei, C. L., Soh, S. W. L., Hibberd, M. L., Liu, E. T., Rohwer, F. & Ruan, Y. (2006). RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* **4**, e3.
221. Zhang, X., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K. & Acheson, D. W. (2000). Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* **181**, 664–70.
222. Zhou, Z., Li, X., Liu, B., Beutin, L., Xu, J., Ren, Y., Feng, L., Lan, R., Reeves, P. R. & Wang, L. (2010). Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor. *PLoS One* **5**, e8700.



## **8. ANEXOS**



## ANEXO 1. OTRAS PUBLICACIONES

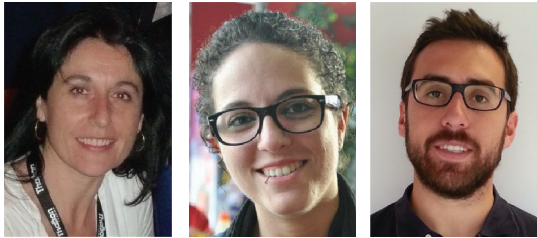
A continuación se detallan por orden cronológico otras publicaciones no incluidas en la tesis:

- 1) **Muniesa M, Allué-Guardia, Martínez-Castillo A**. 2013. Bacteriophage-driven emergence of novel pathogens. *Future Virol.* 8(4), 323–325
- 2) **Martínez-Castillo A, Muniesa M**. 2014. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 16;4:46.
- 3) **Allué-Guardia A, Martínez-Castillo A, Muniesa M**. 2014. Persistence of infectious Shiga toxin-encoding bacteriophages after disinfection treatments. *Appl Environ Microbiol* 80 (7): 2142-2149.
- 4) **Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J, Navarro F, Muniesa M**. 2014. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(1): 606-609
- 5) **Quirós P, Martínez-Castillo A, Muniesa M**. 2015. Improving detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by molecular methods by reducing the interference of free Shiga toxin-encoding bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 81(1): 415-421.





# Bacteriophage-driven emergence of novel pathogens



Maite Muniesa\*<sup>1</sup>, Anna Allué-Guardia<sup>1</sup> & Alexandre Martínez-Castillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, 08028 Barcelona, Spain

\*Author for correspondence: Tel.: +34 93 403 9386 ■ Fax: +34 93 403 9047 ■ [mmuniesa@ub.edu](mailto:mmuniesa@ub.edu)

“...phages ... are important for bacterial pathogenicity through genetic mobilization and interchange.”

Those who work with bacteriophages like to point out that phages are probably the most abundant entities in the biosphere, and present the extraordinary total population number of  $10^{31}$ . There are many descriptions of a significant proportion of the bacterial genes found in the viral (phage) DNA fraction of different environments [1,2]. Therefore, the evidence that phages mobilize bacterial genes has an important impact on our conception of the role played by phages in the evolution of bacteria.

For obvious reasons, interest in research into the evolution of bacterial pathogens has increased, and most work focuses on the incorporation or mobilization of genes related to pathogenicity. Nevertheless, the role of phages in genetic mobilization is not limited to just that one aspect, since other genes that are essential for bacterial physiology or metabolism can be mobilized by phages as well. An excellent example of this are the photosynthesis genes found in cyanophages [3].

A temperate phage may incorporate a specific gene into its genome during the progress of its lytic cycle, if the chromosomal prophage is incorrectly excised. This process, known as specialized transduction, is restricted to temperate phages and results in the mobilization of a single gene that has become inserted into the particle [4]. There are several examples of virulence genes mobilized within phage particles, for instance many toxin genes (Shiga toxin, diphtheria toxin, cholera toxin and cytolethal distending toxin, among others) [5]. When infecting a new host, the temperate phage carrying a toxin gene inserts itself into the host chromosome and bestows the new characteristic upon the recipient cell, making it toxigenic.

However, there is a second mechanism that could better explain the wide diversity and abundance of bacterial genes within the viral DNA fraction much better: generalized

transduction. In generalized transduction, many phages, whether virulent or temperate, undergo their lytic cycle, but mistakes during the encapsidation process lead to the introduction of bacterial DNA into the phage capsid (phage virion). There are phages specifically dedicated to generalized transduction, such as P22 in *Salmonella* or P1 in *Escherichia coli* [4]. Due to erroneous packaging of bacterial DNA fragments, a percentage of the particles contain bacterial DNA instead of phage DNA. Once produced, the transducing particles continue the lytic cycle and are able to insert their DNA into a new susceptible host (the capsid will still be able to insert DNA into a new cell, since it depends on host receptor recognition, rather than on the genomic content). Once in the cell, the DNA circulates and could have different fates: if it is plasmid DNA, it will remain as a plasmid; it may continue to circulate within a minor fraction of the population in an unsuccessful infection; it could be integrated into the bacterial chromosome through recombination (which would be legitimate if the recipient were related to the donor bacteria, or illegitimate if there were no related sequences); or it may be degraded by the nucleases of the recipient cell. Given these possibilities, it seems that the frequency of generalized transduction could be even greater than previously thought [6].

In general, many headful packaging phages can generate ‘generalized transducing’ particles. Specialized transducing phages (such as the lambda phage, which has a nonheadful packaging system, known as cos) could generate generalized transducing particles too [7]. So in fact, many types of phages are able to conduct generalized transduction and mobilize genes between bacteria of the same species or genera, or even inter-genera [8,9].

This potential to infect diverse bacterial hosts may increase the involvement of phages in

## Keywords

- bacterial evolution
- bacteriophages
- horizontal gene transfer
- mobile genetic element



# Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

Alexandre Martínez-Castillo and Maite Muniesa\*

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Edited by:**

Eelco Franz, Centre for Infectious Disease Control, Netherlands

**Reviewed by:**

Eelco Franz, Centre for Infectious Disease Control, Netherlands  
Stefano Morabito, Istituto Superiore di Sanità, Italy

**\*Correspondence:**

Maite Muniesa, Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain  
e-mail: mmuniesa@ub.edu

In this review we highlight recent work that has increased our understanding of the distribution of Shiga toxin-converting phages that can be detected as free phage particles, independently of Shiga toxin-producing bacteria (STEC). Stx phages are a quite diverse group of temperate phages that can be found in their prophage state inserted within the STEC chromosome, but can also be found as phages released from the cell after activation of their lytic cycle. They have been detected in extraintestinal environments such as water polluted with feces from humans or animals, food samples or even in stool samples of healthy individuals. The high persistence of phages to several inactivation conditions makes them suitable candidates for the successful mobilization of *stx* genes, possibly resulting in the genes reaching a new bacterial genomic background by means of transduction, where ultimately they may be expressed, leading to Stx production. Besides the obvious fact that Stx phages circulating between bacteria can be, and probably are, involved in the emergence of new STEC strains, we review here other possible ways in which free Stx phages could interfere with the detection of STEC in a given sample by current laboratory methods and how to avoid such interference.

**Keywords:** bacteriophages, Shiga toxin, STEC, environment, transduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are important food-borne pathogens and represent a challenge for the scientific community. Effort has been devoted to developing methods for its isolation, detection and identification, to guarantee the quality of products and the health of consumers. Many studies have aimed at gaining an understanding of the mobility of the important gallery of virulence factors that compose the virulome of the *E. coli* pathogenic strains. The mobility of these factors among strains is a key factor for the genotypic and phenotypic variability of this bacterium, and hinders the process of determining what should be considered a true pathogen and how to detect it effectively (Erickson and Doyle, 2007; Karch et al., 2012; Melton-Celsa et al., 2012).

Thus, the methods for *E. coli* detection have focused on those factors that are clearly related with virulence and, particularly, those that are closely related with high incidence and severity of human infections. Among these factors, the Shiga toxin (Stx) is considered one of the most significant and, if not the only one determining pathogenicity, the one that leads to the most undesirable complications of the infection, such as HUS (Tarr et al., 2005).

Stx is a good example of a mobile virulence factor, since the genes encoding for this toxin are located in the genome of temperate bacteriophages (Newland et al., 1985; Huang et al., 1987; O'Brien et al., 1989). Many phages simply multiply by infecting bacteria, killing the host by lysis and releasing new phages. Temperate phages, however, adopt a benign relationship with their hosts, called lysogeny, which allows an attachment of phage

DNA to a bacterial chromosome. For Stx phages, once a phage integrates its genome within the bacterial genome, the bacteria acquires the *stx* gene and with it the capacity to express the toxin; thereby becoming a STEC. Temperate phages can revert from the lysogenic state by entering the lytic cycle, mostly due to environmental conditions or exogenous factors. The lytic pathway starts by generating multiple copies of its genome, causing an increase in the Stx produced by the cell during the process (Neely and Friedman, 1998; Wagner et al., 2001; Tyler et al., 2004). By the expression of the phage genome, new phage capsids are generated, assembled with the phage DNA and, once formed, phage particles are released from the cell by lysis. Once released, phage particles remain free outside the bacterial cell, and here is where our story starts.

The major question we address is: what happens to phages outside the cell and to what extent does their occurrence as free particles play a role in the evolution of new STEC strains?

Phages are rather simple particles and Stx phages are no exception. Their persistence outside the cell is guaranteed by their ability to circumvent natural and artificial inactivation processes (as reviewed in the next section), many of which would inactivate their bacterial host. It is the fact that the life cycle of phages switches to the lytic state that allows phages to be released once the cell has been threatened by factors that activate its SOS response (Muhldorfer et al., 1996; Kimmitt et al., 2000; Köhler et al., 2000; Yamamoto et al., 2003; Aertsen et al., 2005; Toshima et al., 2007; Pacheco and Sperandio, 2009).

# Persistence of Infectious Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages after Disinfection Treatments

Anna Allué-Guardia, Alexandre Martínez-Castillo, Maite Muniesa

Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**In Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), induction of Shiga toxin-encoding bacteriophages (Stx phages) causes the release of free phages that can later be found in the environment. The ability of Stx phages to survive different inactivation conditions determines their prevalence in the environment, the risk of *stx* transduction, and the generation of new STEC strains. We evaluated the infectivity and genomes of two Stx phages ( $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557) under different conditions. Infectious Stx phages were stable at 4, 22, and 37°C and at pH 7 and 9 after 1 month of storage but were completely inactivated at pH 3. Infective Stx phages decreased moderately when treated with UV (2.2- $\log_{10}$  reduction for an estimated UV dose of 178.2 mJ/cm<sup>2</sup>) or after treatment at 60 and 68°C for 60 min (2.2- and 2.5- $\log_{10}$  reductions, respectively) and were highly inactivated (3  $\log_{10}$ ) by 10 ppm of chlorine in 1 min. Assays in a mesocosm showed lower inactivation of all microorganisms in winter than in summer. The number of Stx phage genomes did not decrease significantly in most cases, and STEC inactivation was higher than phage inactivation under all conditions. Moreover, Stx phages retained the ability to lysogenize *E. coli* after some of the treatments.**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are pathogenic and cause a wide range of diseases, with symptoms varying from noncomplicated diarrhea to the life-threatening hemolytic-uremic syndrome (HUS) (1, 2). STEC produces two immunologically distinct toxins known as Shiga toxin 1 (Stx1) and Shiga toxin 2 (Stx2), and both toxins present diverse variants (1).

The genes encoding Stx in *E. coli* are located in the genomes of inducible temperate bacteriophages (Stx phages) (3). Induction of the lytic cycle of Stx phages causes an increase in production of Shiga toxin, which is the virulence factor responsible for severe complications associated with the infection, such as HUS (2, 4). In addition to the increase in Stx expression, the lysis of the cell caused by Stx phages allows the release of Stx outside the cell and also the dissemination of Stx phages. Free Stx phages spread within the gut and are excreted with the feces (5). In terms of occurrence in the environment, Stx phages have been found in water bodies containing fecal contamination of human or animal origin (6–12). Infectious Stx phages have also been detected in food samples, and despite the abundance of Stx phages in these samples, they showed levels of bacterial indicators (aerobic colony counts and *E. coli*) that make them acceptable for consumption according to European regulations (13).

The widespread distribution of Stx phages in different environments indicates that they must be able to persist under diverse conditions. Previous studies suggested the persistence of environmental Stx phages (7). Newly developed molecular methods for the quantification of Stx phages (14), the development of new approaches for the optimal detection of plaques formed by infectious Stx phages (15), and optimized protocols for the generation of lysogens of Stx phages allowed us to collect more reliable and quantifiable data about the persistence of infectious Stx phages and Stx phage genomes following various inactivation and disinfection processes and to evaluate their capacity for transduction after such treatments. Our hypothesis is that if Stx phages could persist better than STEC against the different inactivation conditions assayed, they possibly can generate lysogens after some of these conditions. If our hypothesis is true, this fact, together with their wide occurrence in different environments, should lead to

the conclusion that Stx phages are a potential threat for the emergence of new STEC serotypes in the environment.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacteriophages, strains, and media.** Stx2 bacteriophages  $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557 were induced from *E. coli* O157:H7 *stx*<sub>2</sub>-positive strains A534 and A557 isolated from cattle (16). Recombinant phages  $\Phi$ 534 $\Delta$ *stx*:*cat* and  $\Phi$ 557 $\Delta$ *stx*:*cat* (17), in which a fragment of the *stx* was replaced by a chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene, were used for transduction experiments. Bacteriophage SC12 was isolated from river water (18) and was used as a control virulent phage infecting *E. coli* strain WG5.

*E. coli* WG5 (ATCC 700078) was used as the host strain to evaluate the infectivity of Stx phages and the control phage and as a host for the generation of lysogens. Wild-type *E. coli* O157:H7 strain A557 (16) was the STEC strain used to evaluate bacterial inactivation.

Luria-Bertani (LB) broth and LB agar were used to culture bacteria. LB soft agar containing 0.7% agar was supplemented with 5% glycerol (15) to improve plaque observations. Trypticase soy agar (TSA) and ChromoCult coliform agar (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the quantification of STEC strains. When necessary, media were supplemented with chloramphenicol (20  $\mu$ g/ml). Phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl [pH 7.4]) was used to make dilutions of bacteria and phages.

*E. coli* strain DH5 $\alpha$  transformed with pBAD-TOPO Vector (Invitrogen Corporation, Barcelona, Spain) containing a fragment of the *stx*<sub>2</sub> gene was used to prepare the standard for a real-time quantitative PCR (qPCR) (14).

**Induction and isolation of Stx2 bacteriophages.** Lysogens of Stx phages  $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557 (16) were incubated under agitation (180 rpm) at 37°C to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.3, as measured with a spectrophotometer (Spectronic 501; Milton Roy, Belgium). To induce

Received 3 December 2013 Accepted 21 January 2014

Published ahead of print 24 January 2014

Editor: C. A. Elkins

Address correspondence to Maite Muniesa, mmuniesa@ub.edu.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.04006-13

# Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Human Fecal Samples

Pablo Quirós,<sup>a</sup> Marta Colomer-Lluch,<sup>a</sup> Alexandre Martínez-Castillo,<sup>a</sup> Elisenda Miró,<sup>b</sup> Marc Argente,<sup>b</sup> Juan Jofre,<sup>a</sup> Ferran Navarro,<sup>b</sup> Maite Muniesa<sup>a</sup>

Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain<sup>a</sup>; Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Barcelona, Spain<sup>b</sup>

**A group of antibiotic resistance genes (ARGs) (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *mecA*, *armA*, *qnrA*, and *qnrS*) were analyzed by real-time quantitative PCR (qPCR) in bacteriophage DNA isolated from feces from 80 healthy humans. Seventy-seven percent of the samples were positive in phage DNA for one or more ARGs. *bla*<sub>TEM</sub>, *qnrA*, and, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> were the most abundant, and *armA*, *qnrS*, and *mecA* were less prevalent. Free bacteriophages carrying ARGs may contribute to the mobilization of ARGs in intra- and extraintestinal environments.**

Antibiotic resistance may be obtained by spontaneous mutations or acquired by the incorporation of antibiotic resistance genes (ARGs) (1). ARGs spread between cells by using genetic platforms known as mobile genetic elements (MGEs). The most commonly studied MGEs are plasmids, transposons, integrons, and, more recently, bacteriophages (2).

Bacteriophages or phage-related elements carry ARGs in Gram-positive (3–6) and Gram-negative (7–10) bacteria. Recently, some studies have suggested that the role of phages carrying ARGs in the environment is much more important than previously thought (2, 11–13). Abundant ARGs have been reported in the bacteriophage DNA fraction of fecally contaminated water (14–16), and metagenomic analyses indicate that there are abundant ARGs in viral DNA (17). As a result of their higher incidence in clinical settings, much effort has been devoted to the study of plasmids, integrons, and transposons. However, there is little information on phages carrying ARGs in clinical settings.

This study analyzes a group of ARGs in phage DNA isolated from stool samples. The ARGs studied include two groups of beta-lactamase genes from Gram-negative bacteria (*bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>); *mecA*, responsible for resistance to methicillin in *Staphylococcus* spp.; *armA*, a gene which confers high-level resistance to aminoglycosides in Gram-negative bacteria; and *qnrA* and *qnrS*, plasmid-mediated genes that provide some degree of reduced quinolone susceptibility.

The study was performed using 80 human fecal samples from 46 females and 34 males from 6 months to 102 years of age who visited the Sant Pau Hospital (Barcelona, Spain) during a 6-month period. Stool samples were processed according to conventional protocols for the isolation of enteropathogenic bacteria, rotavirus, and adenovirus and were microscopically examined for protozoa. Only samples that were negative for these pathogens were included in the study. None of the patients selected was involved in a food-borne outbreak or showed any severe gastrointestinal pathology. To our knowledge, none of the patients were receiving antibiotic treatment during the time of the study, although previous antibiotic treatments could not be excluded.

Fecal samples were homogenized to a 1:5 (wt/vol) dilution in phosphate-buffered saline (PBS) by magnetic stirring for 15 min. Fifty milliliters of the homogenate was centrifuged at 3,000 ×g, and the phage lysate was purified and concentrated as described

previously (15, 16). Phage suspensions were treated with DNase (100 U/ml) to eliminate free DNA outside the phage particles. To confirm total removal of nonencapsidated DNA, eubacterial 16S rRNA genes and the different ARGs (see Table S1 in the supplemental material) were evaluated in the sample after DNase treatment and before its disencapsidation.

Phage DNA was extracted from the suspension as previously described (16, 18). Total DNA (including Gram-positive and Gram-negative bacterial and viral DNA) was extracted from 200 μl of the homogenate by use of a QIAamp DNA stool minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA) in accordance with the manufacturer's instructions.

Standard and quantitative PCR (qPCR) procedures for *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>, and *mecA* were performed as previously described (16). The *armA* qPCR assay was designed using the sequence of *armA* in plasmid pMUR050 (NC\_007682.3) from an *Escherichia coli* pig isolate (19). pMUR050 was also used to generate standard curves (16). The *armA* qPCR assay has an average efficiency of 98.4% and a detection limit of 2.74 gene copies (GC). The *qnrA* qPCR assay detects seven variants (*qnrA* 1 to 7), and the *qnrS* qPCR assay detects six variants (*qnrS* 1 to 6) (20). The 565-bp fragment of *qnrA* was obtained from *E. coli* strain 266, and the 425-bp fragment of *qnrS* was obtained from the environmental strain *Enterobacter cloacae* 565 isolated from sewage. Both fragments were cloned in pGEM-T-Easy vector (Promega, Barcelona, Spain) to generate the standard curves (16). The *qnrA* qPCR assay showed 98.2% efficiency and a detection limit of 3.1 GC/μl, and the *qnrS* assay showed 99.4% efficiency and a detection limit of 8.3 GC/μl. All qPCR assays (see Table S1 in the supplemental material) were performed under standard conditions (15, 16). To

Received 2 August 2013 Returned for modification 29 September 2013

Accepted 19 October 2013

Published ahead of print 28 October 2013

Address correspondence to Maite Muniesa, mmuniesa@ub.edu.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01684-13>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.01684-13



# Improving Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by Molecular Methods by Reducing the Interference of Free Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages

Pablo Quirós, Alexandre Martínez-Castillo,  Maite Muniesa

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) by culture methods is advisable to identify the pathogen, but recovery of the strain responsible for the disease is not always possible. The use of DNA-based methods (PCR, quantitative PCR [qPCR], or genomics) targeting virulence genes offers fast and robust alternatives. However, detection of *stx* is not always indicative of STEC because *stx* can be located in the genome of temperate phages found in the samples as free particles; this could explain the numerous reports of positive *stx* detection without successful STEC isolation. An approach based on filtration through low-protein-binding membranes and additional washing steps was applied to reduce free Stx phages without reducing detection of STEC bacteria. River water, food, and stool samples were spiked with suspensions of phage 933W and, as a STEC surrogate, a lysogen harboring a recombinant Stx phage in which *stx* was replaced by *gfp*. Bacteria were tested either by culture or by qPCR for *gfp* while phages were tested using qPCR targeting *stx* in phage DNA. The procedure reduces phage particles by 3.3 log<sub>10</sub> units without affecting the recovery of the STEC population (culturable or assessed by qPCR). The method is applicable regardless of phage and bacteria densities and is useful in different matrices (liquid or solid). This approach eliminates or considerably reduces the interference of Stx phages in the detection of STEC by molecular methods. The reduction of possible interference would increase the efficiency and reliability of genomics for STEC detection when the method is applied routinely in diagnosis and food analysis.**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) bacteria are a class of enteric pathogens capable of causing severe gastrointestinal disease (hemorrhagic colitis) that can develop undesirable complications, such as acute kidney failure (hemolytic-uremic syndrome [HUS]) that could require lifelong treatment (1, 2). STEC strains belonging to different serotypes, notably strains of serotype O157:H7, have been the causative agents of large outbreaks of food-borne disease. However, the emergence of non-O157 STEC strains with various combinations of virulence genes also represents a serious challenge for the protection of consumers from food-borne disease (3, 4).

The identification of STEC strains, which requires culture enrichment on selective medium, is advisable to confirm and characterize the pathogen. However, recovery of the strain responsible for the disease is not always possible because it could be present in low concentrations, the cells might not be in a culturable state, or there could be interference from commensal *E. coli* within the microbiota in the sample. The need for early identification of STEC demands the use of faster and more robust methods.

STEC strains present genomic plasticity that complicates discrimination of the pathogenic strains among other *E. coli* strains present in a sample. For this reason, DNA and protein detection methods have been developed to target the genes related to virulence (5–7) and genes that help to identify a specific serotype (8). Reliable methods focused on the detection of virulent serotypes (for instance, O26, O45, O111, O103, O121, and O145, accounting for the non-O157 serotypes, plus O157:H7) (9) are very useful for known pathotypes or for epidemiological purposes. However, the recent outbreak caused by *E. coli* O104:H4 in Germany (10) highlighted the limitations of methods based on the detection of only well-known serotypes when an unusual one is present. In order to better assess the presence of an unknown STEC serotype

in a sample, it appears to be necessary to establish protocols that target specific virulence genes, alone or preferentially in combination, instead of serotypes.

Many DNA-based methods for STEC detection include PCR techniques (5–7, 11–13), including standardized methods approved by legislation of the European Union (14, 15). Moreover, next-generation sequencing (NGS) protocols are emerging, and their implementation is advised to improve detection (10, 16).

The main virulence determinant of STEC, responsible for the most undesirable complications of infection such as HUS, is the Shiga toxin (Stx). *stx* genes are encoded in the genome of temperate bacteriophages (Stx phages) inserted as prophages into the STEC chromosome (17) or in enteric bacteria other than STEC, such as *Citrobacter* (18). Moreover, Stx phages can be found as free phages in environments that include urban sewage and animal wastewater (19, 20), human feces (21, 22), and even food (23), and they are extremely persistent in the natural environment (24–26).

When PCR-based and NGS methods are applied to detect

Received 9 September 2014 Accepted 23 October 2014

Accepted manuscript posted online 31 October 2014

Citation Quirós P, Martínez-Castillo A, Muniesa M. 2015. Improving detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by molecular methods by reducing the interference of free Shiga toxin-encoding bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 81:415–421. doi:10.1128/AEM.02941-14.

Editor: D. W. Schaffner

Address correspondence to Maite Muniesa, mmuniesa@ub.edu.

P.Q. and A.M.-C. contributed equally to this article.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.02941-14



## ANEXO 2. COMPOSICIÓN MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES

### Anexo 2.1 Medios de cultivo

#### Caldo LB (Luria-Bertani):

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bidestilada (bd)

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente y/o 4°C.

#### LB ss (semisólido):

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 7 g agar Bacteriológico Europeo
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente y/o 4°C.

#### LB agar:

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 15 g agar Bacteriológico Europeo
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min, dispensar en placas de Petri y guardar a 4°C.

#### TSA (Trypticasein soy agar):

- 40 g TSA comercial
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min, dispensar en placas de Petri y guardar a 4°C.

#### Caldo TSB (trypticasein soy broth):

- 17 g caseína peptona
- 3 g peptona de soja
- 5 g NaCl
- 2,5 g fosfato dipotásico



- 2,5 g dextrosa
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a 4°C.

**Chromocult® (Merck):**

- 26,5 g chromocult™
- 1 l H<sub>2</sub>O bd

Calentar y remover hasta que quede bien disuelto. Cuando empiece a hervir, sacar del fuego y esperar hasta que se enfríe a 45-50°C. Entonces añadir el suplemento (2 viales de suplemento selectivo para *E. coli*/ coliformes), dispensar en placas de Petri y guardar a 4°C.

**Macconkey agar (Conda)**

- 50 gramos McConkey agar comercial
- 1 l H<sub>2</sub>O bd

**SOB (Super Optimal Broth)**

- 20 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 0,5 g NaCl
- 10 ml KCl 250 mM
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd
- Ajustar pH a 7,0

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min

- 5 ml MgCl<sub>2</sub> (esteril) y guardar a 4°C

**SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression)**

Como el SOB, pero además añadiendo 20 ml de glucosa 1M y guardar a 4°C.

## **Anexo: 2.2 Soluciones y tampones**

### **PBS (Phosphate buffered saline):**

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 0,2 g hidrofosfato de potasio
- 1,15 g hidrofosfato de sodio heptahidratado
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd
- Ajustar el pH a 7,1-7,2.

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

### **Ringer ¼:**

- 2,5 g Ringer Powder comercial
- 1 l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

### **Tampón SM:**

- 5,8 g NaCl
- 2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O
- 50 ml Tris HCl 1M pH 7,5
- 0,1 g gelatina
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

### **Tampón de desnaturalización:**

- 20 g NaOH
- 87,66 g NaCl
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd estéril

No esterilizar, guardar a temperatura ambiente.

### **Tampón de neutralización:**

- 87,66 g NaCl
- 500 ml Tris HCl 1M pH 7,4
- Enrasar a 1l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**Tampón 1 de hibridación:**

- 100 ml Tris HCl 1M pH 7,5
- 100 ml NaCl 1,5M
- 800 ml H<sub>2</sub>O bd

No esterilizar, guardar a temperatura ambiente.

**Tampón 2 de hibridación:**

- 5 g agente bloqueante (Roche®)
- Enrasar a 1 l tampón 1

Disolver por calor (baño) y guardar a -20°C.

**Tampón 3 de hibridación:**

- 100 ml Tris HCl 1M pH 9,5
- 100 ml NaCl 1M
- 50 ml MgCl<sub>2</sub> 1M
- 750 ml H<sub>2</sub>O bd

Preparar inmediatamente antes de su uso, con soluciones estériles.

**Tampón de Anticuerpo-anti-digoxigenina:**

- 10 µl anticuerpo anti-digoxigenina (Roche®) en 50 ml de tampón 2.

**Tampón de prehibridación:**

- 50 ml SSC (“saline sodium Citrate”) 20X
- 2 ml N-lauryl sarcosina al 10%
- 0,4 ml SDS (“sodium dodecyl sulfate”) 10%
- 2 g agente bloqueante (Roche®)
- 145 ml H<sub>2</sub>O bd

Disolver por calor (baño) y guardar a -20°C.

**Tampón de hibridación:**

- 50 ml tampón de prehibridación
- 10 µl sonda marcada con dUTP (Roche®)
- SDS 10%:
- 10 g SDS
- 100 ml H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**N-lauryl-sarcosin 10%:**

- 10 g N-lauryl-sarcosina
- Enrasar a 100 ml H<sub>2</sub>O bd

Disolver y esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**Tampón SSC 20X:**

- 175,32 g NaCl
- 88,23 g citrato sódico
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**Tampón SSC 10X:**

- 500 ml SSC 20X
- 1 l H<sub>2</sub>O bd

No esterilizar, guardar a temperatura ambiente.

**Tampón SSC 2X:**

- 100 ml SSC 20X
- 1 l H<sub>2</sub>O bd

No esterilizar, guardar a temperatura ambiente.

**2X SSC + 0,1% SDS:**

- 50 ml SSC 20X
- 5 ml SDS 10%
- 445 ml H<sub>2</sub>O bd

No esterilizar, guardar a temperatura ambiente.

**0,04X SSC + 0,1% SDS:**

- 1 ml SSC 20X
- 5 ml SDS 10%
- 494 ml H<sub>2</sub>O bd

No esterilizar, guardar a temperatura ambiente.

**2X SSC + 1% SDS:**

- 50 ml SSC 20X.
- 50 ml SDS 10%

- 400 ml H<sub>2</sub>O bd

No esterilizar, guardar a temperatura ambiente.

**Tritón NaOH:**

- 0,2 ml tritón X-100
- 100 ml NaOH 0,5N

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**"Washing buffer" o tampón de lavado:**

- 3 g Tween 20
- Enrasar a 1l de tampón 1 de hibridación

Mezclar con agitación magnética y guardar a temperatura ambiente.

**Mitomicina C:**

- 0,5 mg mitomicina C
- 1 ml H<sub>2</sub>O bd estéril

Una vez preparado, conservar a 4°C en oscuridad.

**EDTA 0,5M pH:7**

- 18,6 g EDTA (Triplipetex<sup>®</sup>) (ácido etilendiaminotetraacético)
- Ajustar pH:7

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**ADNasa y ARNasa:**

- 10 mg ADNasa o ARNasa
- 1 ml H<sub>2</sub>O bd estéril

Una vez preparado, conservar a -20°C.

**Proteinasa K:**

- 20 mg proteinasa K
- 1 ml H<sub>2</sub>O bd estéril

Conservar a -20°C.

**Tampón proteinasa K:**

- 2 ml Tris HCl 1M pH 8

- 2 ml EDTA 0,5 M pH8
- 10 ml SDS 10%
- Enrasar a 100 ml H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a T<sup>a</sup> ambiente.

**Acetato sódico 3M:**

- 24,6 g acetato sódico
- Enrasar a 100 ml H<sub>2</sub>O bd
- Ajustar el pH a 4,5- 5,5 con HCl 37%

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**Etanol 70%:**

- 70 ml EtOH 100%
- 30 ml H<sub>2</sub>O bd estéril

No esterilizar, guardar a temperatura ambiente.

**TBE 10X (Tris Boric EDTA Buffer):**

- 109 g Tris Base
- 55,6 g ácido bórico
- 9,2 g EDTA
- Enrasar a 1l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**TBE 1X:**

- 100 ml TBE 10X
- 900 ml H<sub>2</sub>O bd estéril

Guardar a temperatura ambiente

**Gel de agarosa:**

- 150 ml TBE 1X

Agarosa al 0,8%, 1%, 2% (p/v) o en el porcentaje adecuado en cada caso.

Calentar en el microondas hasta se haya disuelto por completo la agarosa, evitando que hierva.

**Dye buffer o tampón de carga:**

- 40% solución de sacarosa
- 0,25% azul de bromofenol

Guardar a 4°C sin esterilizar.

**Bromuro de etidio para tinción de geles de DNA**

- 200 µl de la solución stock (1% en p/v) de bromuro de etidio (Merck®)
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd

**Tampón de lavado (membranas de diálisis):**

- 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 5 ml EDTA 0,2M (pH 8-8,5)
- 995 ml H<sub>2</sub>O bd estéril

Disolver por agitación. Preparar antes de usar.

**Tampón EDTA (membranas de diálisis):**

- 5 ml EDTA 0,2M (pH 8-8,5)
- 995 ml H<sub>2</sub>O bd estéril

Disolver por agitación. Preparar antes de usar.

**Resolving Buffer**

- 181,71 g Tris
- 4 g SDS
- Ajustar pH: 8,8
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**Stacking buffer**

- 60,57 g Tris
- 4 g SDS (sodium dodecyl sulfato)
- Ajustar pH: 6,8
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd
- Esterilizar a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.

**Tampón muestras proteínas**

- 5 ml glicerol
- 2,5 ml β-mercaptoetanol

- 1,15 g SDS
- 0,38 g Tris
- 0,02% Azul de bromofenol
- Ajustar pH: 6,8
- Enrasar a 33 ml H<sub>2</sub>O bd estéril

#### **Tampón diálisis CsCl**

- 24,22 g Tris
- 0,14 g EDTA
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd
- Ajustar pH: 7,8

Disolver por agitación. Preparar antes de usar.

#### **Solución desteñir Coomasie**

- 200 ml metanol
- 150 ml ácido acético
- 650 ml H<sub>2</sub>O bd estéril

Guardar a T<sup>a</sup> ambiente.

#### **Tampón TE pH8**

- 1,212g Tris
- 0,372g EDTA
- Ajustar pH: 8
- Enrasar a 1 l H<sub>2</sub>O bd

Esterilizar a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente.





**ANEXO 3. PROTOCOLOS**

**Reacción de PCR.** Se usaron dos reacciones de PCR de casas comerciales diferentes, se describen a continuación

Fermentas®:

Reactivos	Cantidad
DreamTaq	12,5 µl
Cebador Up (30 µM)	0,5 µl
Cebador Lp (30 µM)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O bd esteril	9,5 µl
ADN	2 µl
Volumen final	25 µl

Roche®:

Reactivos	Cantidad
Taq Roche®	0,4 µl
dNTPs (25mM)	0,4 µl
Tampón	5 µl
Cebador Up (30µM)	1 µl
Cebador Lp (30µM)	1 µl
H <sub>2</sub> O bd esteril	38,2 µl
ADN	4 µl
Volumen final	50 µl

**Reacción de secuenciación** (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit):

Reactivos	Cantidad
Master Mix 3.1	1 µl
Tampón Big Dye 3.1	3 µl
Cebador (5 µM)	1 µl
H <sub>2</sub> O bd estéril	Y µl
ADN	X µl
Volumen final	20 µl

La cantidad de ADN dependerá del tamaño del fragmento a secuenciar, teniendo en cuenta la siguiente relación: 100ng ADN para cada 100 pb. Se hará una reacción de secuenciación para cada cebador.

### Real time qPCR

El primer paso para la realización de la qPCR es el diseño de los cebadores y la sonda, específicos de la secuencia que se quiere detectar. En concreto en esta tesis se usaron cebadores y sonda para la detección de los genes *saa* y *stx<sub>2</sub>*. Tanto para *saa* como para *stx<sub>2</sub>* se usaron sondas TaqMan<sup>®</sup> marcadas con el fluorocromo FAM. Para el diseño de cebadores y sondas se usó el programa Primer Express, siguiendo los estándares que dicta Applied para su diseño, como son que la secuencia a amplificar tenga entre 50 y 150 pb, el tamaño de la sonda sea mayor que los cebadores, siendo la T<sub>m</sub> de los cebadores entre 58 - 60°C y la sonda entre 68- 70°C, evitar que hayan más de tres repeticiones de una base en los cebadores, sobretodo evitar repeticiones guanina (G) y evitar que hayan más de 3 guaninas o citosinas (C) en los extremos 3'. Además en el diseño de la sonda es importante que no hayan G o la combinación GA en el extremo 5' y 3 G juntas.

El fragmento que se va a cuantificar se debe amplificar mediante PCR y a continuación clonarlo en el plásmido pGEM-T-Easy (Promega, Barcelona, España), que permite la clonación directa de fragmentos de PCR. La construcción se transforma por electroporación en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Una vez comprobada que la construcción ha sido transformada correctamente, se realiza una extracción de ADN plasmídico y una posterior cuantificación por NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies. Thermoscientifics. Wilmington. USA).

Se realizan diluciones desde la 10<sup>-1</sup> a la 10<sup>-10</sup> con tampón TE, con 5-6 réplicas por dilución. Se cargan tres replicas en la qPCR en 4-6 procesos independientes para realizar la recta estándar. Se conservarán las diluciones a -20°C y se utilizan al menos 4 diluciones en cada placa de amplificación.

La reacción de qPCR puede realizarse a partir de un stock cebadores y sonda mezclados y suministrados por la casa comercial (Applied Biosystems), en concentraciones de 18 $\mu$ M para los cebadores y 5 $\mu$ M para la sonda

Reactivos	Cantidad
Mix de cebadores y sonda TaqMan	1 $\mu$ l
TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems)	10 $\mu$ l
ADN	9 $\mu$ l
Volumen final	20 $\mu$ l

Otra opción es realizar la qPCR a partir de sondas y cebadores que viene por separado en cuyo caso habrá que dispensarlas en alícuotas y resuspenderlas a la concentración deseada. Los cebadores se preparan una concentración de 80mM. A continuación se diluyen 25 $\mu$ l del cebador a 80mM, en 75  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bd estéril, y serán los que finalmente se usan. Respecto a la sonda, se usa hace una dilución 1:20. Se realizará una solución de cebadores y sonda con las diluciones realizas con relación 1:1:1. En este caso la reacción se realizará siguiendo el siguiente protocolo:

Reactivos	Cantidad
Mix 1:1:1 de sonda Taqman y cebadores	3 $\mu$ l
TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems)	10 $\mu$ l
ADN	7 $\mu$ l
Volumen final	20 $\mu$ l

El número de copias genómicas (GC) por  $\mu\text{l}$  se calcula a partir de la ecuación de la recta estándar, asumiendo que la masa media de una molécula son 660Da (g/mol) por 1pb de ADNds. El cálculo se realiza usando la siguiente formula:

$$\text{Copias genómicas (GC)/}\mu\text{l muestra} = \left( \frac{X \text{ (ng/}\mu\text{l)}}{P_{\text{pGEM::gen}} \times 660 \times 10^9 \text{ (ng/mol)}} \right) \times 6.023 \times 10^{23}$$

X: Concentración de ADN del constructo pGEM-T-Easy::*saa/stx*<sub>2</sub> (ng/ $\mu\text{l}$ )

$P_{\text{pGEM::gen}}$ : Longitud del plásmido con el inserto (pb)

$6.023 \times 10^{23}$ : Número de Avogadro

### qPCR expresion

Para evaluar la expresión de ARNm de un gen de interés siempre hay que compararlo con un gen que se exprese de manera constitutiva dentro de la bacteria, tras lo que realiza una comparación relativa del número de copias de ARNm por RT qPCR.

El protocolo utilizado para la extracción de ARNm fue el descrito por Promega para *E.coli* SV total RNA Isolation System.

La reacción de RT-PCR se realiza a partir de la Power SYBR<sup>®</sup> Green RNA-to-C<sub>T</sub> 1 –Step Kit. Cada extracción se hará por duplicado, una con los genes de interés y otra con el gen constitutivo. El protocolo de reacción es el descrito el anexo 1.

Reactivos	Cantidad
retrotranscriptasa	0,16 $\mu$ l
RT-PCR Mix	10 $\mu$ l
cebador Up ( 5 $\mu$ M)	0,7 $\mu$ l
cebador Lp ( 5 $\mu$ M)	0,7 $\mu$ l
ARN	8,44 $\mu$ l
Volumen final	20 $\mu$ l

### **Transformación y clonaje en pGEM-T Easy (Promega):**

#### Amplificación del gen de interés y purificación del amplímero

Se realiza la PCR del fragmento del gen que se quiere clonar y se purifica dicha banda. Si al revelar el gel de agarosa se observan sólo una banda se hará mediante el kit de purificación de ADN por producto de PCR (Qiaquick PCR Purification kit), según las instrucciones del fabricante. Si hay más de una banda habrá que realizarlo a partir de purificación geles de agarosa (Qiaquick Gel Extraction Kit).

#### Ligación del gen de interés en pGEM-T-Easy (Promega)

Se realiza la mezcla de ligación siguiendo lo aconsejado por la casa comercial:

Reactivos	Cantidad
2x tampón de ligación	5 $\mu$ l
Vector pGEM-T-esasy-	1 $\mu$ l
Producto de PCR	2 $\mu$ l
T4 ADN ligasa	1 $\mu$ l
H2O bd estéril	1 $\mu$ l
Volumen final	10 $\mu$ l

Mezclar la reacción suavemente con la pipeta e incubar 1 hora a temperatura ambiente y guardar en la nevera si es para usar inmediatamente, sino guardar a -20°C

### Clonación del gen en *E. coli* DH5 $\alpha$

- 1) A partir de un cultivo de 18 horas de DH5 $\alpha$  en LB, se hace una dilución 1:10 .
- 2) Cuando la DO<sub>600</sub> este entre 0,3- 0,5, se para el crecimiento dejando el cultivo 10 minutos en hielo.
- 3) Centrifugar 3000xg a 4°C durante 10 minutos.
- 4) Resuspender el pellet en 400  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bd estéril fría y pasar a un tubo de 1,5 ml. A partir de este paso, las células y el H<sub>2</sub>O se mantienen en hielo.
- 5) Hacer un pulso de centrifuga a las células y descargar el sobrenadante y volver a resuspender en 400  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bd estéril fría. Repetir este paso 5-8 veces.
- 6) En el último resuspender en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bd estéril fría.
- 7) Añadir los 10  $\mu$ l de la reacción de ligación.
- 8) Pasar a una cubeta de electroporación (en hielo) y electroporar.
- 9) Incubar en 3ml de LB a 37°C en estático durante mínimo 1 hora.
- 10) Sembrar en placas de LB/Ampicilina<sub>100</sub> e incubar 18 h a 37°C.
- 11) Las colonias crecidas son las que en principio han incorporado pGEM con el fragmento insertado. Verificar por PCR con los cebadores del fragmento de interés. Comprobar por secuenciación

### **Transformación y clonaje de un gen o fragmento de ADN en un plásmido:**

- 1) Obtención del fragmento de ADN: realizar una reacción con enzimas de restricción (Fermentas) que corten a lado y lado del fragmento o gen a clonar e incubar a 37°C durante 2-3 h.

Reactivos	Cantidad
H <sub>2</sub> O bd estéril	16 µl
10X Buffer	2 µl
ADN (0,5-1 µg/µl)	1 µl
Enzima restricción (10 u/ µl)	0,5- 2 µl

- 2) Purificación del fragmento con un Kit de purificación de geles
- 3) Extracción del plásmido que se usará como vector mediante un kit de purificación de plásmido
- 4) Una vez extraído el plásmido, linealizar mediante reacción de restricción usando la misma enzima que se ha usado para el fragmento de ADN (que cortará en la “*multiple cloning site region*”), de manera que se creen extremos cohesivos y se pueda producir una correcta ligación. También se puede dar el caso que los extremos generados entre el plásmido y el fragmento no sean cohesivos, porque han sido cortados con un enzima diferente. En tal caso, habrá que formar extremos romos para poder ligarlos (ver protocolo extremos romos).
- 5) Purificación del plásmido con un Kit de producto de PCR, para inactivar y eliminar la enzima.
- 6) Para que el plásmido no se pueda ligar por sí mismo, ya que sus extremos son cohesivos entre sí, se desfosforila utilizando la fosfatasa alcalina (ver protocolo desfosforilación)
- 7) Realizar la reacción de ligación del fragmento y el plásmido, hay que tener en cuenta la siguiente formula:

$$\text{Masa inserto (ng)} = \frac{a \times \text{Masa del vector (ng)} \times \text{Longitud del Inserto (pb)}}{\text{Longitud del vector (pb)}}$$

a: Si son extremos cohesivos= 3; si son extremos romos = 5

- 8) La reacción de ligación se realiza usando Fast-Link™ ADN Ligation Kit



Para extremos cohesivos incubar 5 minutos a temperatura ambiente:

Reactivos	Cantidad
10X Fast-LinK Ligation Buffer	1,5 µl
10 mM ATP	1,5 µl
Vector	X µl
Inserto ADN	Y µl
Ligasa Fast-LinK	1 µl
H <sub>2</sub> O bd estéril	Z µl
Volumen final	15 µl

Para extremos romos incubar 15 minutos a temperatura ambiente:

Reactivos	Cantidad
10X Fast-LinK Ligation Buffer	1,5 µl
10 mM ATP	0,75 µl
Vector	X µl
Inserto ADN	Y µl
Ligasa Fast-LinK	1 µl
H <sub>2</sub> O bd estéril	Z µl
Volumen final	15 µl

Los volúmenes del vector y del inserto dependerán de la formula anterior, y el volumen de agua será el necesario hasta llegar al volumen final.

- 9) Inactivar la ligasa 15 min a 70°C.
- 10) A continuación se transforma por electroporación (ver protocolo de transformación).

### Protocolos de hibridación

Para llevar a cabo la hibridación primero se produce la sonda con digoxigenina para el gen que se quiere detectar, usando el PCR DIG Synthesis Kit (Roche):

Reactivos	Cantidad
Taq polimerasa (1)	0,75 $\mu$ l
DIG Mix (2)	5 $\mu$ l
Tampón + MgCl <sub>2</sub> (3)	5 $\mu$ l
Cebador up	1 $\mu$ l
Cebador lp	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bd estéril	33,25 $\mu$ l
ADN	4 $\mu$ l
Volumen final	50 $\mu$ l

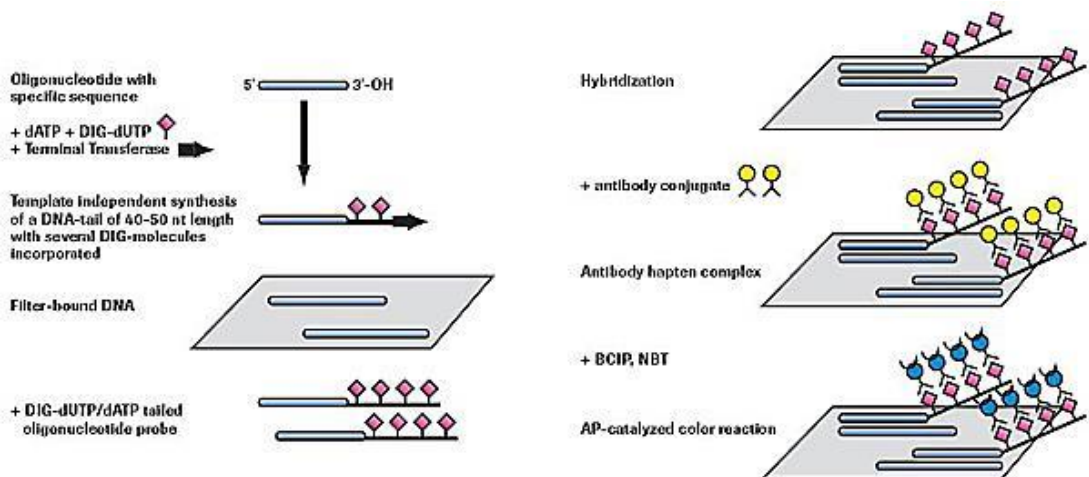
Usando el mismo programa que se usaría para amplificar el fragmento en una PCR convencional. En este método, los dUTPs van unidos a una molécula de digoxigenina (DIG). Los dUTPs, al ser análogos de los dTTPs son incorporados por la polimerasa en la amplificación sustituyendo a los dTTPs por lo que el amplímero queda marcado en x posiciones con DIG. Al ser más pesado el amplímero con DIG que el que se ha amplificado con nucleótidos normales, se puede ver la diferencia de pesos de las bandas al realizar una electroforesis en gel de agarosa y observar tras la tinción con bromuro de etidio. Se observa que la banda marcada se encuentra más arriba en el gel que la no marcada.

**Hibridación colonial** (“colony blot”, Nizetic *et al.*, 1991, y protocolo descrito por Roche® para la detección de la sonda):

Con este protocolo se pretendió caracterizar las colonias/estrías positivas para un determinado gen, mediante una sonda específica. El protocolo se basó en la transferencia de las colonias/estrías a una membrana de nylon de alta afinidad por los ácidos nucleicos. A continuación se eliminaron los restos celulares bacterianos para tener el ADN celular lo más accesible posible.

Después de realizar varios lavados, se aplicó un tampón que contenía una sonda específica para la región del genoma que se quiso detectar, marcada con digoxigenina, que se incorporó mediante una reacción de PCR tal como se describe en el apartado anterior.

El revelado se realiza con un anticuerpo específico para la digoxigenina (antidigoxigenina), unido covalentemente a una enzima, la fosfatasa alcalina, que en presencia de una solución conteniendo los sustratos del enzima (NBT/BCIP, Roche®), produce una desfosforilación que provoca que la molécula precipite y que el lugar donde est vire de color a azul-lila. Por tanto, se observó coloración en aquellas zonas que habían hibridado con la sonda



Hibridación colonial (*Colony blot*):

- 1) Las colonias bacterianas se transfirieron a una membrana de nylon con gran afinidad por los ácidos nucleicos (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham®). La placa de agar con colonias/ estrías se mantuvo en contacto con la membrana durante dos minutos, para favorecer una completa transferencia.
- 2) Se colocó la membrana (siempre boca arriba) en papel Whatman® 3mm empapado con tampón de desnaturalización (Anexo 2) durante 20 min y luego se secó la membrana 5 min.
- 3) Se transfirió la membrana sobre nuevo papel Whatman® con Tritón-NaOH durante 10 min, y se dejó secar de nuevo 5 min.
- 4) Se empapó papel Whatman® con tampón de neutralización y se colocó encima la membrana 10 min. Se secó la membrana durante 5 min.
- 5) Se lavó la membrana 5 min con 2XSSC en agitación sobre una placa de Petri y luego se dejó secar 5 min más.
- 6) Se añadió un control positivo en un extremo de la membrana (1-2 µl de producto de PCR positivo para la región donde la sonda debe unirse). Se volvió a dejar secar la membrana.
- 7) Se fijó el ADN con luz UV, 2 min irradiando cada cara de la membrana (empezando por la de abajo, la cara no hibridada). En este punto las membrana se pueden guardar a 4°C envueltas en papel de celofán, para realizar el resto del protocolo más adelante

Eliminación de los restos celulares

- 8) La membrana se lavó con 2XSSC+1% SDS a 50°C en agitación 20 min.
- 9) El segundo paso fue el lavado con 2XSSC+0,1% SDS, 10 min a temperatura ambiente en agitación.
- 10) Finalmente, el último lavado fue con 2XSSC, 10 min a temperatura ambiente en agitación.

### Pre-hibridación

- 11) La pre-hibridación se realizó a 68°C al menos 1 h en tampón de pre-hibridación (10 ml de tampón por cada membrana, en tubos de hibridación) y en agitación. Esto permitió no sólo equilibrar la membrana para la hibridación, sino que la presencia de un agente bloqueante en el propio tampón impide la unión inespecífica de la sonda en zonas de la membrana libres de ADN, impidiendo la aparición de falsos positivos.

### Hibridación

- 12) Se eliminó el tampón de pre-hibridación y se añadió 6 ml por cada membrana del tampón de hibridación (conteniendo 10 µl sonda específica / 50 ml tampón de pre-hibridación). La hibridación se realizó a 64°C, en agitación durante 18 horas.

### Lavado y revelado

- 13) Se realizaron dos lavados de 5 min a temperatura ambiente y agitación con 2XSSC+0,1% SDS.
- 14) Después, la membrana se lavó 2 veces a 64°C en 0,04XSSC+0,1% SDS, 15 min.
- 15) A continuación se trató 5 min con tampón 1, en agitación a temperatura ambiente.
- 16) Entonces se puso en tampón 2 y se incubó 30 min, también en agitación a temperatura ambiente.
- 17) Para la detección de la sonda se incubaron las membranas en tampón 2 + anticuerpo anti-digoxigenina (10 µl Anti-dioxigenin Roche® por cada 50 ml de tampón 2) y se incubó 30 min en agitación a temperatura ambiente.
- 18) Para eliminar el exceso de anticuerpo, se realizaron 2 lavado de 15 minutos con tampón de lavado.
- 19) La membrana se puso en tampón 3 (preparado al momento) durante 5 min para equilibrarse.
- 20) Para la reacción colorimétrica se mezclaron 2 ml de tampón 3 y 40 µl de NBT/BCIP (Roche®) y se añadió a cada membrana (en una bolsa de plástico o una placa de Petri

estéril). Se incubó al menos 2 h en oscuridad para poder visualizarse la reacción colorimétrica. Las zonas de la membrana que se corresponden con colonias/estrías positivas viran a un color azul-violeta.

#### **Hibridación de calvas de lisis (“*plaque blot*”, Sambrook y Russell, 2001):**

El proceso es prácticamente igual al “colony blot”, transfiriendo las calvas de lisis a la membrana e hibridando con la sonda específica para luego detectarla con una solución de revelado, pero con la excepción de que no se realizan algunos de los lavados intermedios, necesarios en el caso de tener colonias aisladas para eliminar los restos celulares.

#### Transferencia de calvas lisis

- 1) Se colocó la membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham®) sobre el agar semi-sólido de las placas conteniendo las calvas de lisis previamente enfriado a 4°C durante 1 hora. La membrana se deja en contacto durante 5 min para la transferencia de las calvas de lisis.
- 2) Sobre el papel Whatman® 3 mm empapada en tampón de desnaturalización se colocó la membrana de nylon, boca arriba, durante 5 min .
- 3) Se transfirió la membrana a un nuevo papel Whatman® con tampón de neutralización durante 5 min. Se dejó secar de nuevo 5 min.
- 4) La membrana se lavó con 2XSSC 5 min y luego se dejó secar.
- 5) En este punto se añadió el control positivo (1-2 µl de producto de PCR) en un extremo de la membrana y se dejó secar.
- 6) El ADN se fijó con UV 2 min por cada cara (primero la cara inferior)..

A partir de este punto, el protocolo sigue los mismos pasos que el descrito para la hibridación colonial, a partir de la pre-hibridación.

### Extracción de ADN fágico:

El ADN fágico se extrajo de diferentes grupos de muestras: a partir de cultivos bacterianos lisogénicos para el fago en estudio y a partir de muestras ambientales. A partir de lisógenos bacterianos. El cultivo se incubó en LB hasta llegar a la fase exponencial ( $DO_{600}$  0,3- 0,5). Se añadió mitomicina C a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y se incubó 18 horas a 37°C en la oscuridad y en agitación (180 rpm).

- a) Biosólidos ambientales. Se procesaron 5 g de muestra, diluyendo 1/10 en PBS o Ringer (50 ml de volumen final).
- b) Agua de río. Se procesaron 100 ml de muestra.
- c) Agua residual. Se procesaron 50 ml de muestra tal como se explica a continuación.

Una vez preparados los diferentes tipos de muestras, se procedió a realizar el siguiente protocolo de extracción:

- 1) Para separar la fracción fágica de las células bacterianas y otras partículas, el cultivo se centrifugó 10 min a 3500  $\times g$  a 4°C. El sobrenadante se filtró con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de baja adsorción proteica (Millipore).
- 2) Particularmente en el caso de muestras ambientales, provenientes de volúmenes mayores, las muestras se concentraron en concentradores de proteínas (Amicon) de 100KDa (Millipore) a 3500 rpm, ajustando el tiempo en función del tipo de muestra y de la capacidad de reducción del volumen. El volumen final fue de 0,5-1 ml, dependiendo de la muestra.
- 3) Se añadió 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se centrifugó a 16000 $\times g$ . El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml.
- 4) **Tratamiento con ADNasa:** Se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de ADNasa (10 mg/ml) por ml de muestra y se incubó 1h a 37°C. Después del tratamiento se cogió una alícuota (unos 20  $\mu\text{l}$ ) y se guardó a -20°C como control de la eficiencia de la ADNasa para eliminar cualquier ADN no encapsidado (control de ADN no fágico).

- 5) Se añadieron 12  $\mu\text{l}$  de **proteínasa K** (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y 0,5 ml de tampón proteínasa K por ml de muestra. Incubación 1 h a 55°C.
- 6) Precipitación del ADN fágico. La muestra se mezcló en una proporción 1:1 vol/vol con fenol/cloroformo (1:1 vol/vol) en tubos de phase lock (5-Prime) y se centrifugaron a 16000xg durante 5 min. Se añadió cloroformo (1:1 vol/vol). Se centrifugó de nuevo a 16000xg 5 min.
- 7) El ADN se dejó precipitar o/n a 4°C añadiendo 0,1 del volumen de acetato sódico 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto.
- 8) El ADN precipitado se recogió en tubos de 1,5 ml y se centrifugó 30 min a 16000xg a 4°C. Después se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 300  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%. Centrifugar 10 min a 16000xg.
- 9) Se descartó el sobrenadante y el pellet de ADN se secó 1-3 h a temperatura ambiente (o 30 min en la vitrina de extracción de gases) y se eluyó en 50  $\mu\text{l}$  de TE

#### Análisis por RFLP y Southern-blot:

Las enzimas elegidas para realizar el ensayo fueron *EcoRI* y *ClaI*. Para su elección se utilizó el programa NEBcutter de NEW ENGLAND BioLabs®.

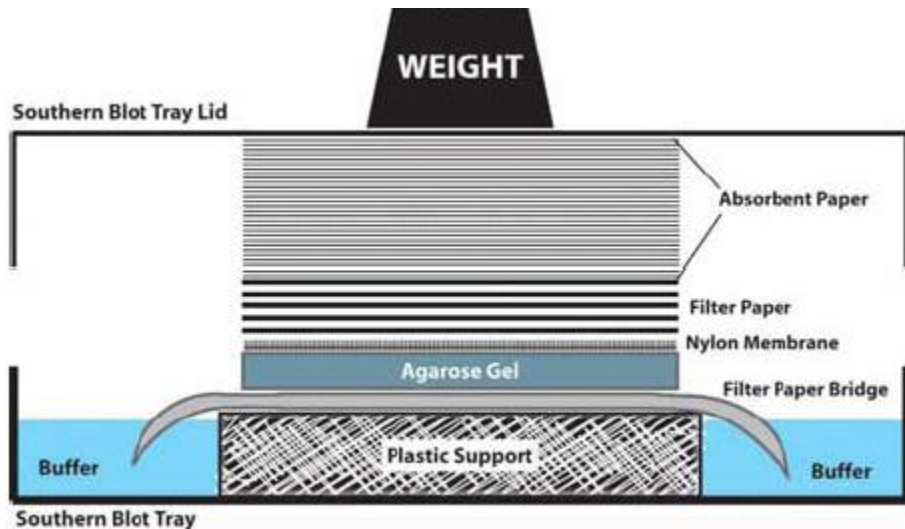
Primero fue necesario obtener la muestra de ADN (proceso de extracción fágica, descrito anteriormente).

- 1) Reacción de restricción para un volumen final de 30  $\mu\text{l}$ :

Reactivos	Cantidad
Tampón	3 $\mu\text{l}$
Enzima de restricción	1,5 $\mu\text{l}$
ADN concentración 0,5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	X $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O bd estéril	Y $\mu\text{l}$
Volumen final	30 $\mu\text{l}$



- 2) Para que el enzima actuase se incubó durante 2 h a 37°C sin agitación.
- 3) El producto de la restricción se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa del 0,8% (p/v). Ya que es recomendable que sea grueso, prepararlo en 200ml de TBE 1X. Se añadieron a los 30 µl de la muestra 6 µl del tampón de carga (Dye buffer). El ADN del fago λ cortado con HindII EcoRI se usó como marcador de peso molecular ( 3 µl demarcador λ, 4 µl de Dye y 13 µl de H<sub>2</sub>O). La electroforesis se dejó durante 18 h a 25 V o 4h a 60V.
- 4) La visualización del ADN en el gel de agarosa se realizó mediante tinción con bromuro de etidio, dejando incubar el gel 10-15 min. Tras este tiempo se fotografió.
- 5) Antes de la transferencia a la membrana de Nylon, el gel fue tratado con tampón de desnaturalización durante 30 min en agitación.
- 6) A continuación se cambió el tampón y se realizó otro lavado de 5 min - 1 h con tampón de neutralización.
- 7) Entonces se procedió al montaje de la cubeta para la transferencia por capilaridad:
  - a) Se dispuso de un cristal apoyado encima de la bandeja que fue cubierto con papel Whatman®, y se embebió con tampón SSC 10X.
  - b) Se cortaron tres trozos de papel Whatman®, del mismo tamaño que el gel y la membrana, donde se transferiría el ADN. Todo esto se embebió con el tampón SSC 10X.
  - c) Se situó el gel conteniendo el ADN
  - d) Se situó la membrana de nylon encima del gel y se embebió con tampón SSC 10X.
  - e) Encima de la membrana se colocaron otros tres papeles Whatman® embebidos en el mismo tampón.
  - f) Para favorecer la transferencia del ADN por capilaridad se colocó una pila de papeles de filtro y se acabó de rellenar la cubeta con tampón SSC 10X. El montaje se incubó durante 18 h a temperatura ambiente.
  - g) Se situó algún peso en el extremo superior.



- 8) Una vez finalizada esta transferencia se dejó secar la membrana, se le aplicó el control positivo (amplímero de PCR) en una esquina (del mismo modo que en la hibridación colonial y de calvas de lisis) y se fijó el ADN con UV (2 min/cara). Después tuvo lugar la prehibridación y la hibridación con la sonda correspondiente, del mismo modo que en la hibridación colonial y de calvas de lisis.

### **Inducción de bacteriófagos y obtención de suspensiones fágicas:**

Para la obtención de la fracción fágica de fagos atemperados a partir de un cultivo bacteriano lisogénico para ese fago, se siguió el protocolo descrito a continuación:

- 1) Se puso a crecer la cepa bacteriana en caldo LB a 37°C y en agitación a partir de un cultivo de toda la noche (o/n), haciendo una dilución 1:100, hasta alcanzar una  $DO_{600}$  entre 0,3-0,5.
- 2) Para inducir el ciclo lítico de los profagos que contenía la cepa, se añadió mitomicina C a una concentración final de 0,5 µg/ml y se incubó a oscuras a 37°C en un agitador durante 6-18 h.
- 3) Al día siguiente se filtró el sobrenadante con filtros de polietersulfona (PES) de 0,22 µm de baja adsorción proteica (Millipore) para separar la fracción fágica.

- 4) De esta manera, se obtuvo la suspensión de bacteriófagos.

#### **Experimentos de inducción con diferentes agentes inductores:**

- 1) A partir de un cultivo o/n, se puso a crecer la cepa que contenía los fagos en LB a 37°C y agitación hasta alcanzar la fase exponencial ( $DO_{600}$  de 0,3-0,5).
- 2) En este punto se hicieron alícuotas equivalentes en volumen del cultivo, para añadir a cada una un inductor: mitomicina C (a concentración final de 0,5 µg/ml), EDTA (20 mM pH=7,2) o ciprofloxacina (0,4, 1 y 4 µg/ml).
- 3) De la misma manera, se separó una alícuota sin inducir como control de la inducción.
- 4) Las alícuotas se incubaron 18 h a 37°C en agitación (la que contenía mitomicina C se incubó en oscuridad).
- 5) Al día siguiente se compararon los valores de  $DO_{600}$  y de número de fagos infecciosos entre los cultivos con los diferentes inductores y el cultivo sin inducir, para ver el efecto de estos diferentes agentes sobre la inducción del ciclo lítico de los fagos.

#### **Test de la gota y titulación de fagos:**

Este protocolo que se describe a continuación, el test de la gota, tiene como finalidad determinar si los fagos presentes en una muestra son infectivos o no:

- 1) Se puso a crecer la cepa huésped a 37°C en agitación hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,3-0,5, para que esté en fase exponencial.
- 2) Se mezcló en un tubo 0,5 ml de bacteria + 2,5 ml de LB semisólido (LBss) (previamente fundido), se agitó con vórtex y se vertió en una placa de LB agar.
- 3) Se esperó hasta que el LBss estuvo seco y entonces se puso una gota de 10 µl de la suspensión fágica sobre éste (obtenida según el protocolo de inducción).
- 4) Se esperó 10 min para que la gota se absorbiera y se incubó 18 horas a 37°C.

Para saber el título fágico de la muestra (ufc/ml), es decir, el número de fagos infectivos, el protocolo a seguir fue similar, pero realizando diluciones de la suspensión de fagos:

- 1) Se puso a crecer la cepa huésped a 37°C en agitación hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,3-0,5, para que esté en fase exponencial.
- 2) Se mezcló en un tubo 1 ml de bacteria + 2,5 ml de LBss (previamente fundido), + 1ml de la suspensión fágica directa o de la correspondiente dilución, se agitó con vórtex y se vertió en una placa de LB agar
- 3) Se esperó 10 min a que se secase solidificara y se incubó 18 horas a 37°C.
- 4) Se contaron las calvas de lisis que correspondían a las unidades formadoras de calva (UFP)/ml de la suspensión de fagos o de la muestra.

#### **Transducción de fagos y formación de lisógenos:**

Protocolo usado para la transducción de fagos (variación del protocolo descrito en Muniesa *et al.*, 2004):

- 1) Un cultivo o/n de la cepa lisógena para el fago en estudio fue diluido 1:100 en caldo LB y se incubó hasta la fase exponencial ( $DO_{600}$  0,3 - 0,5).
- 2) Se añadió el agente inductor, habitualmente la mitomicina C, a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incubó toda la noche a 37°C en agitación (180 rpm) y en oscuridad.
- 3) Se recuperó el sobrenadante del cultivo, ya que en esta fase se encontraban los fagos libres. cultivo se centrifugó 10 min a 3000 x g a 4°C. El sobrenadante se filtró con filtros PES (Poliéster sulfona, Millipore®) de 0,22  $\mu\text{m}$  de baja adsorción proteica.
- 4) Se añadió cloroformo con una relación 1/10 sobre la suspensión fágica.
- 5) Posteriormente se realizó un banco de diluciones decimales seriadas de la suspensión fágica en Ringer  $\frac{1}{4}$  o PBS o  $\text{H}_2\text{O}$  bd.

- 6) Se mezcló 500 µl de las diluciones fágicas, 100 µl de CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) y 100 µl de la cepa huésped y se incubó 30 min en estático a 37°C.
- 7) Se añadió la mezcla sobre 2,5 ml de LBss y se repartió uniformemente sobre una placa de LB agar que se dejó incubando 18h a 37°C.
- 8) Hay dos posibles resultados:
  - a) Aparición de calvas de lisis
  - b) No aparición de calvas de lisis, donde el resultado también podría ser doble
    - b.1) Aparición de colonias aisladas. En este caso se procedió a su recuento y se resembró (en otra placa de LB agar) el 10% de las colonias totales para ser analizadas para la presencia del fago, y por tanto como posibles transductantes, por hibridación colonial con sonda específica y PCR
    - b.2) No efecto aparente en la monocapa celular.
- 9) En los casos a) y b.2) se recuperó el LBss, con la ayuda de una asa de Drigalsky, y se mezcló en un tubo tipo falcon con 1 ml de tampón SM.
- 10) Se centrifugó a 6000 x g durante 10 min para separar las células del agar.
- 11) Se recuperó el sobrenadante y se incubó 1h a 37°C en reposo.
- 12) Se realizaron diluciones decimales seriadas con PBS y se realizaron siembras de cada dilución sobre placas de LB agar. A continuación se buscaron posibles lisógenos mediante hibridación colonial con sonda específica.
- 13) En caso de detectarse, se verificó que es un lisógeno, mediante PCR, API 20S y PFGE..

Protocolo usado para la transducción de fagos (variación del protocolo descrito en Schmidt *et al.*, 1999). Hasta el punto 6 es igual que el descrito anteriormente.

- 1) Se mezclan 500 µl de la suspensión fágica+ 500 µl de cepa huésped en fase exponencial + 125 µl CaCl<sub>2</sub> 0,1M.

- 2) Se incubó a 37°C durante 2 horas en estático y luego se pasó a incubarlo en agitación durante 18h
- 3) A continuación se hicieron diluciones decimales seriadas en PBS y se realizó hibridación colonial.

En ambos protocolos, en el caso que al fago se le haya insertado algún gen de resistencia a antibióticos, no sería necesario realizar hibridación colonial, ya que la presencia del antibiótico a la cantidad adecuada en el LB agar permite su selección

#### **Purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl (Sambrook y Russell, 2001):**

La purificación de fagos mediante gradientes de CsCl se usó para separar y purificar las diferentes fracciones fágicas de una suspensión de fagos de una muestra. Se siguió el protocolo descrito a continuación:

- 1) Se prepararon los stocks de los diferentes gradientes de densidad de CsCl:

Densidad	CsCl por muestra	H <sub>2</sub> O por muestra
<b>1,7 g/ml</b>	1,124 g	0,875 ml
<b>1,5 g/ml</b>	0,908 g	1,09 ml
<b>1,3 g/ml</b>	0,624 g	1,375 ml

Una vez preparados los stocks, se esterilizaron por filtración con filtros de ésteres de celulosa de alta adsorción protéica de 0,22 µm.

- 2) Se añadió 0,5 g de CsCl a 1 ml de la suspensión de bacteriófagos y se disolvió por agitación.
- 3) En un tubo Ultra-Clear BECKMAN® se añadieron 2 ml de sacarosa al 20%.

- 4) A continuación se procedió a hacer el gradiente con las tres soluciones de CsCl de diferente densidad (1,3 g/ml, 1,5 g/ml y 1,7 g/ml), añadiendo 1 ml de la de menor densidad en el fondo del tubo y, a continuación, ir añadiendo poco a poco las otras dos sucesivamente. Añadiendo cada solución sobre una pipeta Pasteur que habremos depositado previamente en cada tubo. Se marcó con una señal la interfase entre los gradientes.
- 5) Se añadió la suspensión de bacteriófagos sobre el gradiente de 1,3 g/ml.
- 6) Se centrifugó el tubo a 80000xg durante 2 horas a 4°C (ultracentrífuga Beckman, rotor SW41 de ángulo variable), realizando un correcto equilibrado de la centrífuga. Si hay que ajustar el volumen de alguno de los tubos, usar H<sub>2</sub>O bd estéril y tirarla muy lentamente para que se mantengan los gradientes.
- 7) Después de centrifugar, se recuperaron las bandas grises (correspondientes cada una a una fracción fágica de la muestra) mediante punción del tubo con una aguja hipodérmica y dejándola gotear sobre un tubo de 1,5 ml.

Una vez recuperado la suspensión fágica se puede realizar un segundo **gradiente Isopicnico**. Dicho gradiente se realiza igual que el anteriormente descrito pero usando sólo la densidad sobre la que se encontró la banda, es decir si se observó sobre la banda de 1,5 g/ml la suspensión fágica, se depositará sobre la sacarosa 6 ml de CsCl de 1,5g/ml y encima se añadirá la banda recuperada anteriormente, sin necesidad de añadirle CsCl de nuevo. Se centrifugará a 110000xg durante 24 horas a 24°C.

#### **Preparación de muestras para microscopía electrónica:**

Una vez se ha obtenido la muestra de fagos si se han obtenido a partir de un gradiente de CsCl, habrá que eliminar los restos de CsCl. Para ello centrifugar la muestra por un Amicon® Ultra – 0,5ml durante 10 minutos a 10000 x g y luego 1 minuto a 1000 x g para recuperar la suspensión.

- 1) Se utilizan rejillas recubiertas con una película de formvar. Se dejan durante 5 minutos con ultravioleta.
- 2) Se coloca 10 µl de la muestra sobre una parafilm en su cara limpia. A continuación se ponen 3 gotas de H<sub>2</sub>O bd esterilizada con un filtro de 0,22 µm de ésteres de celulosa y 1 gota de Molibdato Amónico al 2% pH: 6,8.
- 3) Se depositara por la cara que posee la película de formvar sobre la muestra 1 minuto.
- 4) Se lavara pasando sobre las 3 gotas de H<sub>2</sub>O bd durante 1 minuto total.
- 5) Finalmente se deposita sobre el agente de tinción (Molibdato) durante 1- 1,5 minutos y el líquido sobrenadante se elimina con un papel de filtro.
- 6) Se guarda como mínimo un día antes, y si puede ser en una cámara de desecación con la humedad controlada (servicio microscopia).
- 7) Se observa al microscopio electrónico (JEOL) a 100KV y entre 80000-200000 X.

#### **Preparación membranas de diálisis**

- 1) Cortar varias trozos del rollo de membranas de diálisis (12-14000 KDA, ALCO®)
- 2) Hervir 10 minutos con tampón bicarbonato- EDTA
- 3) Lavar con H<sub>2</sub>O bd.
- 4) Hervir 10 minutos en EDTA 1mM pH 8
- 5) Mantener a 4°C con tampón EDTA 1M pH 8 hasta su uso.

#### **Electroforesis SDS- PAGE**

Para la observación de proteínas de fagos purificados por CsCl , primero se debe a eliminar el CsCl mediante diálisis.

- 1) Se introduce la suspensión de fagos en un trozo de la membrana de diálisis y se deja 2 horas en el tampón de diálisis, en agitación.
- 2) Después se cambia el tampón y se pone tampón nuevo y se deja o/n.
- 3) Las muestras se calentaron 5 minutos a 95°C con el tampón de carga



- 4) Las muestras se podrán correr en geles preparados comercialmente o elaborarlos.  
Correr el gel a 130 V durante 50 minutos. Se usaron geles del 12 % de poliacrilamida
- 5) Una vez haya corrido el gel teñir con Coomassie durante 10 minutos
- 6) Desteñir con solución de Desteñido incubándola o/n.

	Resolving							Stacking
	6%	8%	10%	11%	12%	13%	15%	5%
Acrilamida	1,2 ml	1,6 ml	2 ml	2,2 ml	2,4 ml	2,6 ml	3 ml	0,42 ml
Tampón	1,56 ml	1,56 ml	1,56 ml	1,56 ml	1,56 ml	1,56 ml	1,56 ml	0,625 ml
H <sub>2</sub> O destilada	3,2	2,8 ml	2,4 ml	2,2 ml	2 ml	1,8 ml	1,4 ml	1,4 ml
APS	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Volumen final	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml

## ANEXO 4: Cebadores usados en este estudio

PCR	Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño amplímero (pb)	Referencia
Fragmento 378 <i>stx<sub>2</sub>A</i>	UP378	GCGTTTTGACCATCTTCGT	378	Muniesa and Jofre 1998
	LP378	ACAGGAGCAGTTTCAGACAG		
<i>stx<sub>2</sub>A</i> subunit	S2AUP	ATGAAGTGTATATTATTTA	979	Muniesa <i>et al.</i> , 2003
	S2ALP	TTCTTCATGCTTAACTCCT		
<i>stx<sub>2</sub>B</i> subunit	GK3	ATGAAGAAGATGTTTATG	270	Rüssmann <i>et al.</i> , 1994
	GK4	TCAGTCATTATTAACCTG		
<i>stx<sub>1</sub></i>	Stx1-a	TCTCAGTGGGCGTTCTTATG	338	Wang <i>et al.</i> , 2002
	Stx1-b	TACCCCTCAACTGCTAATA		
<i>stx<sub>2</sub></i>	Stx2-a	GCGGTTTTATTGCATTAGC	115	Wang <i>et al.</i> , 2002
	Stx2-b	TCCCGTCAACCTTCACTGTA		
<i>stx<sub>2c</sub></i>	Stx2c-a	GCGGTTTTATTGCATTAGT	124	Wang <i>et al.</i> , 2002
	Stx2c-b	AGTACTCTTTCCGGCCACT		
<i>stx<sub>2d</sub></i>	Stx2d-a	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT	175	Wang <i>et al.</i> , 2002
	Stx2d-b	CAGCAAATCCTGAACCTGACG		
<i>stx<sub>2e</sub></i>	Stx2e-a	ATGAAGTGTATATTGTTAAAGTGGA	303	Wang <i>et al.</i> , 2002
	Stx2e-b	AGCCACATATAAATTATTTTCGT		
<i>stx<sub>2f</sub></i>	Stx2f-a	TGTCTTCAGCATCTTATGCAG	150	Wang <i>et al.</i> , 2002
	Stx2f-b	CATGATTAATTACTGAAACAGAAAC		
<i>stx<sub>2g</sub></i>	209F	GTTATATTTCTGTGGATATC	572	Leung <i>et al.</i> , 2003
	781R	GAATAACCGCTACAGTA		
<i>eaeA</i>	EAE-a	ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG	248	Wang <i>et al.</i> , 2002
	EAE-b	GCCTTCATCATTTTCGCTTTC		
<i>saa</i>	Saa-F	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	Paton and Paton, 2002
	Saa-R	ATGGACATGCCTGTGGCAAC		
<i>cdt</i>	CDT-s1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	466	Tóth <i>et al.</i> , 2003
	CDT-s2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG		
	CDT-as1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA		
	CDT-as2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA		

EHEC <i>hlyA</i>	HlyA-a	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG	569	Wang <i>et al.</i> , 2002
	HlyA-b	TACGGGTATGCTGCAAGTTCAC		
<i>map</i>	map-V-for	CATGGCAAAGTACTAACC	328	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	map-V-rev	TAAAACGTGTAATGGGATCC		
<i>espG</i>	espG-V-for	TATTGAAGCCGAGATTTCGC	731	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	espG-V-rev	TCTCGTTGGGGCGGTCTTC		
<i>espF</i>	espF-V-for	ACGCTGCTTCTACTAGG	208	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	espF-V-rev2	GGACGAGAGGGAGTAAATG		
<i>espJ</i>	espJ-V-for	TTCTCTGACAAAATGGAGC	528	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	espJ-V-rev	AATGGTTCTCCAGTCTCAG		
<i>espJ</i>	espJ-V-for2	AATAAAAACAGAGCAAACAGG	522	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	espJ-V-rev	AATGGTTCTCCAGTCTCAG		
<i>espK</i>	espK-V-for	GAACCAGAGTATTTTGGACG	1311	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	espK-V-rev	GACATTCTGCTCTATTCCG		
<i>espK</i>	espK-V-for2	GTAGCGGACTCTCTGG	385	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	espK-V-rev	GACATTCTGCTCTATTCCG		
<i>espM</i>	espM-V-for	CCTCAGCTCTTTTGGTATCAG	542	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	espM-V-rev	ATAACCTGGGATTTTCATTCGTAG		
<i>cif</i>	cif-int-sense	AACAGATGGCAACAGACTGG	383	Marchès <i>et al.</i> , 2003
	cif-int-antisense	AGTCAATGCTTTATGCGTCAT		
<i>nleA</i>	V83-for2	ACAGCAACATGCACCGGAATGC	959-1112	Creuzburg and Schmidt 2007
	V83-rev2	CTCCATCGCACGTATATCAGC		
<i>nleA</i>	V83-for2	ACAGCAACATGCACCGGAATGC	1015-1168	Creuzburg and Schmidt 2007
	V83-rev3	GATATCGATGACCACATCTTCAGG		
<i>nleB1</i>	nleB-V-for	GGAAGTTTGTTCACAGAGACG	297	Coombes <i>et al.</i> , 2008
	nleB-V-rev	AAAATGCCGCTTGATACC		
<i>nleB2-1</i>	nleB2-V-for	AAGGAATATGAGTTAAAGGTC	553	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	nleB2-V-rev	CCTCCCCGAATGAAATACC		
<i>nleB2-1</i>	nleB2-V-for	AAGGAATATGAGTTAAAGGTC	216	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
	nleB2-V-rev2	AGCAGTCTTTTGGTTGACTG		
<i>nleC</i>	nleC-V-for	ACAGTCCAACCTCAACTTTTCC	777	Coombes <i>et al.</i> , 2008
	nleC-V-rev	ATCGTACCCAGCCTTTCG		

<i>nleC</i>	nleC-V-for nleC-V-rev2	ACAGTCCAACCTCAACTTTTCC GGCTCAAAGCATCAAGTATAG	239	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
<i>nleC</i>	nleC-V-for2 nleC-V-rev3	GTAACCTGAATGCCCTTCG GTTGGATCTGATTTGCATCC	216	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
<i>nleD</i>	nleD-V-for nleD-V-rev	GGTATTACATCAGTCATCAAGG TTGTGGAAAACATGGAGC	426	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleE</i>	nleE-V-for nleE-V-rev	GTATAACCAGAGGAGTAGC GATCTTACAACAAATGTCC	260	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleE</i>	nleE-V-for3 nleE-V-rev3	CCGGAAAACGCCCAATGG AAGATTTCTCCATTTACAG	295	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
<i>nleF</i>	nleF-V-for nleF-V-rev	ATGTTACCAACAAGTGTTCTTC ATCCACATTGTAAAGATCCTTTGTT	568	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleF</i>	nleF-V-for nleF-V-rev3	ATGTTACCAACAAGTGTTCTTC CCACTTACAAAAGCACTTAGC	224	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
<i>nleG2</i>	nleG2-V-for nleG2-V-rev	TCAGGTGAAGCACAATCGC CATTGATGCCGTTATTGGTTC	258	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
<i>nleH1-1</i>	nleH1-V-for nleH-V-rev	GTGTGGACTATAACAGGTTG CACTAATAAGATCTTGCTTTCC	486	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
<i>nleH1-2</i>	nleH2-V-for nleH-V-rev	AGCGGATTATACTCAATCAG CACTAATAAGATCTTGCTTTCC	515	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
<i>nleH</i>	nleH-V-for2 nleH-V-rev	CGATACAACAGAGACAAAATG CACTAATAAGATCTTGCTTTCC	149	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
<i>tccP</i>	tccP-F1 tccP-R1	ATGATTAACAATGTTTCTTCACTT TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCC	600-1155	Garmendia <i>et al.</i> , 2005
<i>tccP</i>	tccP-V-for3 tccP-R1	CCTAACTGGCCTGCGCCAACG TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCC	100-687	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
<i>saa</i> variants	VSAAF VSAAR	ACTCGCATAATTGGTGGTG ATCATTGGTATTGCTGTCAT	111	Luchhesi <i>et al.</i> , 2006
qPCR for <i>stx</i> <sub>2</sub>	STX- f STX- r STX-probe	ACGGACAGCAGTTATACCACTCT ACGTTCCGGAATGCAAATCAG FAM-CCAGCGCTGCGACAG-NFQ	65	Imamovic <i>et al.</i> , 2010

qPCR for <i>saa</i>	SAA-RT F	CCGGAGAGGATATCAAAGCAAT	63	Este estudio
	SAA-RT R	CCTCCGTTTTACCGCTACCA		
	SAA- probe	FAM-ACTCGGAGATGTCATATC-NFQ		
<i>saa</i> total	<i>saa</i> -totUP	ATGCTCAAAGAAAATTGTGT	1163	Este estudio
	<i>saa</i> -totLP	TTACCATCCAATGGACATGCC		
<i>tet</i>	Tc-5	TCAGCCCCATACGATATAA	1200	Serra-Moreno et al., 2006
	Tc-3	TGGAGTGGTGAATCCGTTA		
<i>cat</i>	Cm-3	CATATGAATATCCTCCTTA	1015	Serra-Moreno et al., 2006
	Cm-5	TGTGTAGGCTGGAGCTGCTC		
BaeSR	BaeSup	ATGAAGTTCTGGCGACCCGGTA	2127	Imamovic and Muniesa 2012
	BaeRlp	CTAAACGATGCGGCAGGCGT		
$\Delta$ baeSR mutant construction	Tc-5BaeS	TTATATCGTATGGGGCTGACTGAAA GACAAAGCGATCA	1573	Este estudio
	Tc-3BaeR	TAACGGATTCACCACTCCAGCGTA GTAACCGACCGCA		
RT-qPCR assay for <i>bamA</i>	BamA-up	CGTGATGGTGATACCCTTCTG		Este estudio
	BamA-lp	GAGAAAGTAATGCTGGCAATG		
RT-qPCR 16SrDNA of <i>E. coli</i>	Ecoli-F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA		Huijsdens et al., 2002
	Ecoli-R	CGGGTAACGTCATAGAGCAAA		
pGEM construct	pGEM7up	TGTAATACGACTCACTAT		Promega

ANEXO 5: Plásmidos usados en este estudio

