



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Los bacteriófagos como elementos de transmisión genética horizontal de resistencias a antibióticos y toxinas Stx

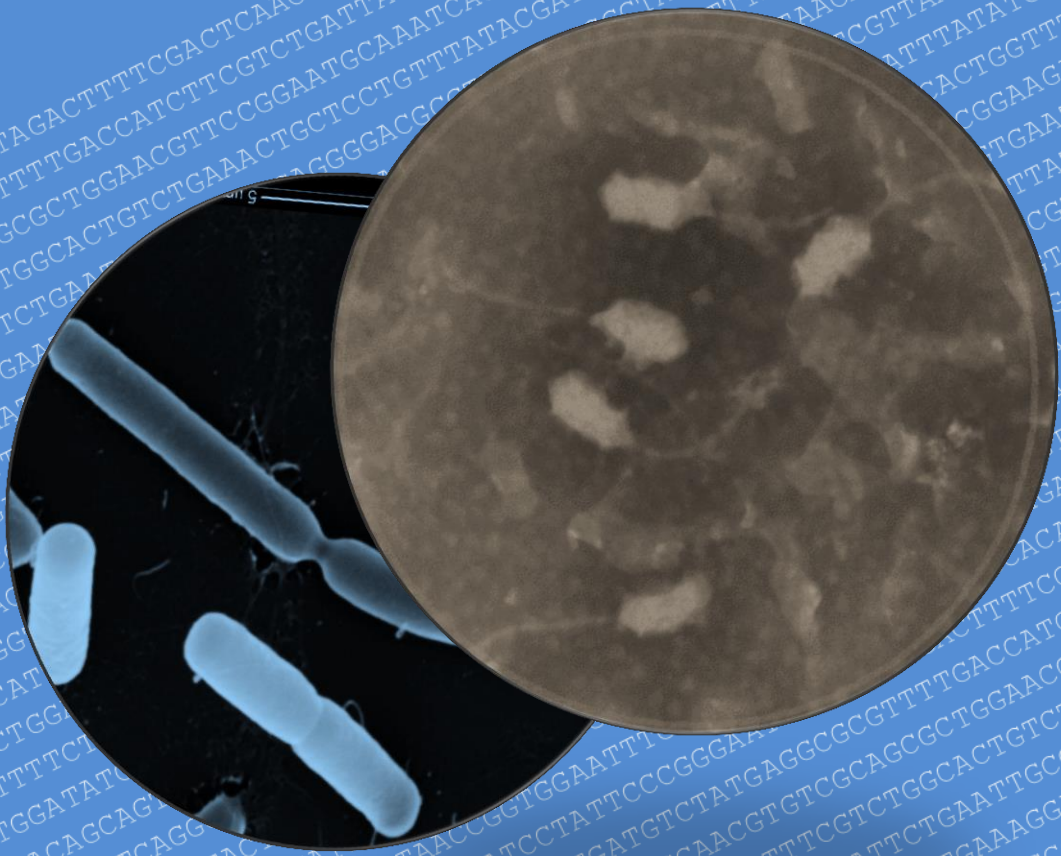
Pablo Quirós Fernández

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (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.

Los bacteriófagos como elementos de transmisión genética horizontal de resistencias a antibióticos y toxinas Stx



Pablo Quirós Fernández

Tesis doctoral, Febrero 2018



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística
Facultad de biología
Universitat de Barcelona

**Los bacteriófagos como elementos de transmisión genética horizontal de resistencias a
antibióticos y toxinas Stx**

Memoria presentada por Pablo Quirós Fernández para optar al grado de doctor por la
Universitat de Barcelona

Programa de doctorado de biotecnología

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. María Teresa Muniesa Pérez en el departamento de
Genética, Microbiología y Estadística de la facultad de biología de la Universitat de Barcelona.

La directora y tutora

El doctorando

M^a Teresa Muniesa Pérez

Pablo Quirós Fernández

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento de escribir estas difíciles líneas, la parte más esperada de la tesis y posiblemente la más difícil, la única que todos os vais a leer. Espero no pasarme ni quedarme corto, allá vamos...

Desde aquel día en el que llegué al laboratorio para realizar las prácticas del master, allá por finales del 2011 hasta hoy, he vivido infinidad de buenos momentos gracias a vosotros. Momentos de aprendizaje, esfuerzo, satisfacción, y diversión. Todos y cada uno de vosotros, en mayor o menor medida, me habéis aportado mucho, y habéis conseguido que cada día que me levantaba para ir a trabajar fuera con una sonrisa en la cara (vale... quizá no cada día, pero si por norma general). Es por esto que ahora me toca a mí decir gracias.

Me gustaría empezar por alguien clave en esta tesis, mi directora, jefa y amiga, **Maite Muniesa**. A ti, Maite debo agradecerte mucho... gracias por haberme dado la oportunidad de entrar en el lab y haber confiado en mí desde el principio. Espero haberte podido corresponder al menos a una parte de esa confianza. Siempre me has ayudado y dirigido de la mejor manera, con una sonrisa cuando las cosas no salían bien (o cuando los controles desaparecían de repente y misteriosamente sin dejar rastro) y con una sonrisa aún mayor cuando todo iba bien. Y siempre has tenido tiempo para mis dudas y preguntas, contigo he aprendido muchísimo. Sabes sacar lo mejor de la gente que trabaja contigo, y siempre utilizando bromas y generando un gran ambiente en el lab. Espero que el “hacer un Pablo” se vuelva costumbre entre tus nuevos doctorandos!

Gracias también al resto de jefes del grupo MARS. A **Joan**, por tu cercanía, tu ayuda y las amenas conversaciones de las tardes en el laboratorio sobre viajes y vivencias. Ah!! Y por la pieza del siglo XIX que me regalaste!

A **Francisco**, por la buena relación que hemos tenido siempre, aún sabiendo que soy madridista y tengo una camiseta de Sergio Ramos, y por enseñarme dos cosas importantes; que lo mejor es intentar ser siempre un “*chico coca-cola*” y el remedio infalible para olvidarme del estrés.

A **Anicet**, por tu simpatía y nuestras divertidas charlas sobre fútbol, que al final siempre nos llevan a que en realidad... seas del equipo que seas, hay cosas mucho más importantes. Es un honor para mí que seas el presidente de mi tribunal de tesis.

A **Cristina**, por toda la ayuda que siempre me has prestado, y por la cercanía y humildad que siempre demuestras.

Al resto de jefes, en especial: a **J.M. Nieto**, por escuchar multitud de temas tristes con nosotros a la hora de comer, a **Josefina Martínez**, compañera de prácticas repetitivas de microscopio y amante del Paraíso Natural, Asturias, a **Carlos Balsalobre**, por prestarme tu ayuda de la mejor manera siempre que la he necesitado, a **Joan Tomás** por el buen trato todos estos años, y finalmente a **Rosina** y **Rosa** por vuestra simpatía.

A toda la gente de secretaría, **Macu**, **Mónica**, **Manolo**, **Susana**, **Rosario** y **Bea**. Gracias por toda la ayuda que me habéis prestado siempre. Porque hacéis entre todos que tener que ir a secretaría sea

algo que apetece, algo divertido. Gracias también por todos los carnavales, rifas y cenas de departamento que habéis organizado!! Y en especial a Rosario y Bea por aquel viaje maravilloso que hicimos a Granada!, aunque no se por qué... no tengo muchos recuerdos del mismo... jaja.

Pasando por fase I, gracias a todos aquellos con los que he tenido y tengo una buena relación, ahora mismo me acuerdo de **Joussef, Manu, Albert, Susana, Lili, Pedro, Anna, Montse y Aurora**, ya no queda nada, fuerza a las dos!!

Al girar la esquina y llegar a fase II, habrá que detenerse un poco e ir más despacio... Lab. 7, gracias por haberme aguantado en tantas electroporaciones, pasar por vuestra puerta y entrar un rato a decir alguna chorrada siempre ha sido divertido. Gracias a **Marcus** por el buen recibimiento que me dio cuando yo era nuevo, y más recientemente gracias a **Zoha, Gabri, Maite y Genoveva** por el buen rollo que siempre hemos tenido, y gracias a **Elena** por la ola de simpatía y frescura que has traído a la fase II desde tu llegada, aún te debo unas cuantas cervezas para celebrar tu reciente entrada en el mundo mamá. Felicidades!.

En el Lab. 8 también tengo que pararme a agradecer bastante, gracias a todos por haberme ayudado y prestado cosas siempre que lo he necesitado, y por las visitas que hacéis al lab. 10 para ver a Aiora, siempre se comenta alguna chorrada graciosa. Gracias **Marta** y felicidades también a ti por el bebé que llega; **Laura Guerrero, Sandra, David** por vuestra simpatía y tener siempre buenas palabras, también a **Alberto**, aunque seas del segundo club de Madrid... Gracias a **Tarik**, único apoyo blanco durante estos años en un mundo blaugrana, a **Xavi** por instruirme en el mundo TUA jeje aunque en principio no somos muy parecidos de forma de ser siempre hemos sabido llevarnos muy bien, a **Eloy** gracias por tantas visitas al lab, bromas y cervezas. Siempre nos lo hemos pasado bien y también gracias por iniciarme en el mundo de la cocina peruana, muy muy buena. Muchas gracias a **Chus** por el gran recibimiento que me diste cuando llegué y cada vez que vienes de visita. El gran **Ayalke!** Amo y señor del departamento, hemos compartidos muchas cervezas, cenas y buenos momentos, eres una gran persona, gracias!

Llegados a este punto, ya hemos llegado a “mi casa” en el departamento. En honor a Laura, o Doctora Sala como le gusta que la llamen, no voy a hacer distinción entre los laboratorios 9 y 10, somos una gran familia.

Cuando llegué al lab a finales de 2011 me encontré con un ambiente impresionante, lleno de personas que hicisteis muy fácil mi adaptación. Con **Miriam A, Arnau y Maru** solo pude compartir unos meses, los suficientes para demostrarme lo buena gente y lo majos que sois, siempre que volvéis de visita es como si no os hubierais ido.

En mi primera época en el lab, tuve la suerte de coincidir con las chicas Disney; **Marta G y Anna A**, y con la más culé que he conocido, **Marta C**. Muchiiiiisimas gracias a las tres por vuestro recibimiento y haberme tratado siempre como a un amigo.

Anna, gracias por tus simpáticas “neuras” que a todos nos hacían reir y por la época Ilustrum! Fue muy divertida. He aprendido de ti entre otras muchas cosas a defender con fiereza mi bote de etanol! Jejeje.

Marta G, gracias por inundar el lab con tu buen rollo, dinamismo y simpatía, al irte el lab se volvió un poco más gris. Por suerte, de vez en cuando nos reunimos a cervecar y cotillear con el resto de

“VIPs”. Por cierto, tengo que reconocer sin que me escuche mucha gente... que a mí también me gustaba el rollo Disney de los viernes!

Marta C, otra “VIP” y mi maestra en el lab cuando llegué! Gracias por enseñarme tanto, aunque para otra vez cambiamos el tipo de muestras con las que aprender, vale? Jeje. Se te echó mucho de menos en tus años en Lubbock, aunque al menos logré que al final estuvieras bien acompañada, no? E grazie mille per andare a Roma! Fueron unos días muy chulos.

Gracias también a los que habéis estado menos tiempo pero igualmente me habéis dejado huella, como a **Ángela**, enemiga irreconciliable en cuanto a bombas de hielo seco y majísima colombiana. A **Ferran**, experto maestro cervecil y guardián del mapa secreto para encontrar las mejores setas de Catalunya, fue divertida tu época en el lab. A **Carla**, que me ha tocado a mí introducirte en el mundo de la microbiología, siempre has sido una “alumna 10”, gracias por tu gran simpatía y ganas de aprender. A **Carmen**, otra chica “VIP”! sencillamente gracias por ser como eres, allá por donde vas desprendes buen rollo, simpatía y ternura, y además te ríes un montón con mis bromas! (esta gente no norteña tiene un humor muy raro...) ¿Que más se puede pedir?.

A **Eli**, contigo he compartido prácticamente todo el tiempo que he estado aquí, siempre nos hemos llevado genial, también hemos compartido unas cuantas cervezas y muchas risas, aunque puede que no sea tu chico favorito del lab 10... jejeje seguro que estoy cerca, gracias Eli!

A **Will**, gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado durante estos años y por los días de gordos! Cosa que echo mucho de menos en mi etapa final, me alegra que te vaya muy bien en tu querido Ecuador.

A **Alex**, desde el principio me trataste como a un amigo y durante estos años me has enseñado muchísimo en el lab. Fuera de él, también hemos compartido muchísimo tiempo con fiestas, cervezas, congresos, cotilleos... Eres un gran amigo (aunque seas un cabronazo y siempre caiga en tus bromas) y una persona muy importante durante toda mi etapa en Barcelona, gracias Alex, eres un crack, amunt Valencia.

A **Laura** (Doctora Sala), gracias por ser una persona divertida como pocas y dinamizadora de eventos navideños del grupo MARS. A veces ángel y a veces demonio (más lo segundo)... Se ha notado mucho tu ausencia en el lab... gracias también por la visita a Roma! Lo pasamos genial.

A **Julia**, la otra norteña! contigo he compartido todo el tiempo en el grupo MARS, prácticamente llegamos y acabamos a la vez. Gracias por no fallarme nunca a la hora del café! Y por toda la simpatía y buen rollo que desprendes cada día doctora!, es fácil llevarse bien contigo. Siento haber sido pesado con tanta pregunta de papeleo para la tesis!

A **Miriam P**, la futbolera de MARS, gracias por nuestras conversaciones sobre fútbol aunque seas antimerengue y nunca veas la realidad!! jajaja. También empezamos a la vez, muuucha suerte en tu última etapa predoc y espero que puedas volver pronto a los campos de Touch!

A **Raquel**, de achuchable a achuchable, eres clave en el buen ambiente de MARS, gracias por ser una persona tan auténtica y natural. Nada sería lo mismo sin tus voces de lab a lab, tus anécdotas imposibles y tus temas tristes!! Sin duda, una de las mejores personas que conozco, gracias por todo Rachel.

A **Maryury**, mi compañera de doctorado durante todo este tiempo en el lab10, muchas gracias por toda la ayuda que me has prestado siempre, por ser una chica tan maja y porque siempre nos hemos entendido y llevado genial, formamos un buen equipo. Ya no te queda nada, mucho ánimo y ojalá pueda ir a hacerte una visita por Colombia en el futuro, me haría ilusión.

A **Aiora**, la última “VIP”! gracias por todo a partir del segundo año (cuando me empezaste a hablar) jajaja. Has sido y eres una persona muy importante desde mi llegada al lab. Hemos compartido muchísimos buenos momentos tanto dentro como fuera del lab, fiestas, cafés, mentas poleo (pacharanes), cervezas y también te has preocupado de ayudarme en los malos. Detrás de esa mirada de lado hay una chica buena!. Eres una gran amiga que no pienso perder, gracias!.

Gracias a todos los que lleváis menos tiempo y pertenecéis a la nueva generación (habrá que preguntar a Laura por cual es... que las tiene contadas). A **Dani**, pese a que tu frecuencia de voz sea imposible de escuchar para los mortales se ve que eres un buen tío, ánimo que aún te queda mucho. Sobre ti va a caer el peso del lab 10! Gracias por enseñarme lo que es y lo que no es un meme!! A **Lorena**, la nueva asturiana del grupo, entraste en MARS a la perfección, te adaptaste en cuatro días. “Prestome mucho conocete” estos meses, habrá que pasarlo bien por Florencia. A **Judith**, deberíamos de darte todos las gracias por ese tatoo molón del halcón milenario! A **Robert**, considerado extraoficialmente como MARS por muy lejos que te manden, a **Laia** por ser siempre tan maja siempre, a **Anna**, que aunque te vemos poco también te has adaptado a la perfección! A **Gerard** y a **Clara**, ánimo que os queda todo por delante! (parezco un viejo diciendo esto...).

Grazie mille, **Stefano, Rossi, Antonella, Valeria, Sonia, Paola, Fabio, Brambilla, Clarissa e Federica**, è stato un piacere lavorare due mesi con tutti a Roma, ci vediamo a Firenze ragazzi!

Saliendo ya del ámbito universidad, me gustaría agradecer a mis compañeros de equipo de **UB+**, porque no hay nada como desconectar con vosotros con un partido de fútbol de vez en cuando entre PCR y PCR, gracias!

Gracias también a mis compañeros de **Ecogen**, por hacerme disfrutar del fútbol cada semana con vosotros desde que empecé la tesis, una gran vía de diversión. Especialmente a **David** y como no, a **Mario Marotta**, un buen amigo hecho en Barcelona.

Gracias al BarnaTeam! **María, Oriol, Carlos, Fran, Ángel M, Ángel C, Jara, Luca, Aritz y Pao**. Me acogisteis como a un amigo desde que llegué (vine pa un finde y mira...) y poco a poco nos hemos hecho muy buenos amigos de verdad, sois grandes, gracias por hacerme disfrutar tanto del tiempo de ocio con vosotros.

Por último, como no, lo más importante, la familia.

Gracias a mis camaradas de la **PAES**, aunque no tengáis ni idea de que va mi trabajo, no importa. Siempre que voy a Oviedo allí estáis para hacérmelo pasar tan bien como siempre lo hemos pasado y olvidarme de todos los problemas. Ole ese Sindicato.

A mis tíos, **M^a Victoria**, estos últimos años te han hecho volverte fuerte, gracias por aguantar de pie los golpes de la vida y seguir siendo tan gran persona con la gente que te quiere, gracias tía. Y a **Bernardo**, por tu alegría inigualable y simpatía infinita, siempre te estaré agradecido.

A mis tíos, **Puri**, gracias por cuidarme tanto siempre, porque cuando voy a verte es como volver un poco a la niñez, por las comidas ricas y el Jamón que me mandas jejeje, aunque como tú dices...no

hace falta dar las gracias a una madre. Y a **Lito**, por desgracia no he podido verte estos últimos años pero tú me transmitiste el cariño por los animales y la naturaleza en general, si he sido primero biólogo y ahora doctor es todo gracias a ti, llevaba tiempo queriendo decírtelo, siempre te lo agradeceré.

A mi abuelo **Pepe**, seguro que estarás muy orgulloso "güeli", aunque aun siendo doctor seguiré sin poder trabajar en la seguridad social como te hubiera gustado... gracias por todo tu apoyo y sencillamente por ser para mí, el mejor abuelo que ha habido nunca.

A mis hermanos, **Jonás y Saúl**, pese a veros mucho menos de lo que me gustaría, siempre estáis ahí para mí, y cada vez que voy a casa y estoy con vosotros es como si nunca me hubiera ido. Gracias por todo, he aprendido y aprendo muchísimo de vosotros, sois muy grandes. Muchas gracias también a **Montse** y a los pequeños de la familia, mis sobrinos **Valeria y Leo**. Me encanta jugar y pasar tiempo con vosotros.

A **Paola**, realmente no tengo palabras para agradecerte tanto estos años, llegamos a Barcelona hace ya 7 años y hemos ido disfrutando de cada día, de cada momento que hemos vivido juntos. Gracias por quererme tanto y ser mi familia. Aún nos queda mucho por seguir construyendo, esta vez como doctoreees jeje. Ya sabes que si "*túno,yono*", te quiero. Y gracias también a Mirto! Que siempre la está liando y no me deja nunca trabajar, pese a todo, nuestro gato es el mejor gato del mundo!

A mis padres, **Jose y Marta**. Podría escribir otra tesis entera solo con todo lo que tendría que agradeceros. Todo esto es gracias a vosotros, siempre me habéis apoyado y dado lo mejor que teníais en todo momento. Por estar siempre ahí, por esa fortaleza sin fin, por habérmelo dado todo y por ser lo mejor que tengo, GRACIAS infinitas.

CONTENIDO DE LA TESIS

Abreviaturas -----	1-3
1. Introducción general -----	5-43
1.1. Orden <i>Enterobacteriales</i>	7
1.2. <i>Escherichia coli</i>	8
1.3. <i>Escherichia coli</i> patogénicas	9
1.4. <i>Escherichia coli</i> productora de la toxina Shiga (STEC)	14
1.4.1 Transmisión, reservorio y fuentes de contagio	14
1.4.2 Factores de virulencia	15
➤ Toxina Shiga (Stx)	
➤ Otros factores de virulencia	
1.4.3 <i>E. coli</i> O104:H4. Una cepa emergente extremadamente virulenta	17
1.5. <i>E. coli</i> y la resistencia a antibióticos	20
1.6. Resistencia a antibióticos	21
1.6.1 La diseminación ambiental de antibióticos y la propagación de microorganismos resistentes	21
1.6.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos	23
1.6.3 Genes de resistencia a antibióticos	23
1.7. Movilidad de factores de virulencia y resistencias a antibióticos	25
1.7.1 Transferencia horizontal de genes (HGT) en <i>Escherichia coli</i>	27
1.8. Bacteriófagos	28
1.8.1 Ciclos de replicación en bacteriófagos	29
1.8.2 Lisis o lisogenia, una importante decisión en fagos atemperados	32
1.8.3 Inducción fágica: activación del ciclo lítico	34
1.8.4 Transducción	35
➤ Transducción generalizada	
➤ Transducción especializada	
➤ Conversión lisogénica	
➤ Gene Transfer Agents (GTAs)	

1.9. Bacteriófagos atemperados: fagos portadores de la toxina Shiga, fagos Stx	39
1.9.1 Fagos Stx en el medio ambiente	40
1.10. Bacteriófagos y genes de resistencia a antibióticos	43
2. Objetivos -----	45-47
3. Publicaciones -----	49-53
3.1. Listado de publicaciones	51
3.2. Informe de participación	52
3.3. Informe del factor de impacto de los artículos	53
4. Resultados -----	55-115
4.1. <u>Capítulo 1</u> : Genes de resistencia en el ADN de bacteriófagos en muestras fecales humanas	57
4.2. <u>Capítulo 2</u> : Los bacteriófagos libres que codifican Stx1 son menos frecuentes que los bacteriófagos de la toxina Shiga 2 en ambientes extraintestinales	67
4.3. <u>Capítulo 3</u> : Contribución de los vegetales y la tierra de cultivo en la propagación de fagos Stx y la emergencia de nuevas cepas productoras de toxina Shiga	85
4.4. <u>Capítulo 4</u> : Mejora de la detección de Escherichia coli productora de toxina Shiga por métodos moleculares mediante la reducción de la interferencia de los bacteriófagos Stx	103
5. Discusión general -----	117-130
6. Conclusiones -----	131-134
7. Bibliografía -----	135-158
8. Anexos -----	159-191
8.1. Otras publicaciones no incluidas en la tesis	161
8.2. Tampones y medios de cultivo	165
8.3. Protocolos realizados	189
8.4. Plásmidos usados	191

ABREVIATURAS

A / E	Adhesión e invasión (“ <i>Attaching and effacing</i> ”)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Afa	Adhesinas afimbriales
AFFs	Fimbrias de adherencia
AIEC	<i>E. coli</i> adherente invasora
ARGs	Genes de resistencia a antibióticos (“ <i>Antibiotic resistance genes</i> ”)
ARN	Ácido ribonucleico
Bd	Bidestilada
Cdt	“Cytotolethal distending toxin”
CFs	Factores de colonización
CG	Copias génicas
CNF	Factores necrotizantes
CsCl	Cloruro de cesio
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
DO	Densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAggEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAggHEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa hemorrágica
EAST	Toxina termoestable de enteroagregativas
EC	Enfermedad de Crohn
EDA	Enfermedad diarreica aguda
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ELF	Fimbria de unión a la laminina de <i>E. coli</i>
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
EspP	Proteasa multifuncional

ET	Elementos transponibles
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
g	Gramo
Gb3	Receptor globotriaosylceramide
GTAs	Agentes de transferencia genética (" <i>Gene transfer agents</i> ")
HCP	Pili hemorrágico de <i>E. coli</i>
HGT	Transferencia genética horizontal (" <i>Horizontal gene transfer</i> ")
HlyA	Enterohemolisina
HUS	Síndrome urémico hemolítico
ICE	Elementos conjugativos integradores (" <i>Integrating conjugative elements</i> ")
Ipa	Antígenos de invasión de plásmidos
IS	Elemento de inserción
Kb	kilobase
L	litro
LEE	("Locus for enterocyte effacement")
LFP	Fimbria polar larga
Lp	Cebador 3'-5' (" <i>Lower primer</i> ")
LT	Toxina termolábil
M	Molar
MET	Microscopio electrónico de transición
MGE	Elementos genéticos móviles (" <i>mobile genetic elements</i> ")
min	Minutos
MPC	Macropinocitosis
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NGS	Secuenciación de nueva generación (" <i>New generation sequencing</i> ")
NTEC	<i>E. coli</i> con factores necrotizantes
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
pAA	Plásmido de adherencia agregativa

PAI	Isla de patogenicidad (" <i>Pathogenicity island</i> ")
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa
Saa	Adhesina aglutinante de STEC
SaPIs	Islas de patogenicidad de <i>S. aureus</i>
spp	Especie
ST	Toxina termoestable
STEC	<i>E. coli</i> productora de la toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga
ufc	Unidades formadoras de colonia
ufp	Unidades formadoras de calvas de lisis
Up	Cebador 5' – 3' (" <i>Upper primer</i> ")
UV	Ultravioleta
VGT	Transferencia genética vertical (" <i>Vertical gene transfer</i> ")
(x)g	Fuerza centrífuga

1. INTRODUCCIÓN GENERAL



1.1. Orden Enterobacteriales

El orden *Enterobacteriales* está formado únicamente por la familia *Enterobacteriaceae*, compuesta por 44 géneros. De los cuales, los más representativos son *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia* y *Yersinia*. Son bacterias Gram negativas, con forma de bacilo en su mayoría, no forman esporas, anaerobias facultativas inmóviles o con flagelos peritricos, oxidasa negativos y con sencillas necesidades nutricionales (Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, 2004). Pueden reducir el nitrato a nitrito, son quimioheterótrofas, siendo indispensables el carbono y el nitrógeno para su crecimiento, y en algunos casos también son necesarias vitaminas y aminoácidos. Los miembros de esta familia se denominan enterobacterias.

Como anaerobias facultativas, las enterobacterias metabolizan los azúcares mediante fermentación cuando no disponen de oxígeno. Existen dos tipos de fermentaciones complejas en este grupo entérico, la fermentación ácido-mixta (*Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*) y la fermentación butanodiólica (*Enterobacter*, *Serratia* y *Erwinia*). La fermentación ácido-mixta produce grandes cantidades de ácido, y además algunas fermentadoras de este tipo pueden convertir el ácido fórmico en CO₂ y H₂, produciendo gas (*Escherichia*, *Proteus* y la mayoría de *Salmonella*). En el caso de la fermentación butanodiólica se produce butanodiol y pequeñas cantidades de ácido (Ingraham, 1998).

La mayoría de las bacterias entéricas se encuentra la parte final del tubo digestivo de los vertebrados, y allí habitan como organismos comensales, facilitando la degradación y adsorción de los alimentos ingeridos. También son relativamente comunes en la cavidad bucal, fosas nasales y tracto genital femenino, o incluso en el suelo y en vegetales.

En ocasiones, algunos miembros de esta familia como *Shigella*, *Salmonella* y *Escherichia* (Jarvis, W. R. and Martone, 1992) se convierten en importantes patógenos entéricos por la adquisición de toxinas y otros factores de virulencia. Otro serio problema de salud relacionado con las enterobacterias es la aparición de nuevas cepas resistentes a antibióticos y otros antimicrobianos, creando graves infecciones nosocomiales en los hospitales (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)).

1.2. *Escherichia coli*

Theodor Escherich aisló y caracterizó por primera vez esta bacteria en heces infantiles, y la denominó *Bacterium coli commune*, en su publicación de 1885 (Escherich). Finalmente el nombre *Escherichia coli* fue reconocido completamente en 1954 (Cowan S.T., 1954).

E. coli es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, oxidasa negativo y clasificado dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, de la clase *Gammaproteobacteria* (Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, 2004). Es capaz de realizar la fermentación del ácido láctico y posee además tres características diferenciales: fermenta la lactosa, es incapaz de utilizar el ácido cítrico como fuente de carbono y convierte el triptófano en indol. Estas características son la base de la mayoría de pruebas bioquímicas para diferenciar *E. coli* de otras bacterias entéricas (Ingraham, 1998).

Las cepas de *E. coli* comensales y patógenas muestran diversas variantes fenotípicas y genotípicas. *E. coli* ha sido tradicionalmente serotipada basándose en tres tipos de antígenos; somáticos (O), capsular (K) y flagelar (H), y se han identificado más de 700 serotipos de *E. coli* basados en la combinación de antígenos O y H (Nataro and Kaper, 1998).

E. coli ha evolucionado para crecer en el tracto intestinal de animales de sangre caliente donde las fuentes de carbono / energía están en abundancia y existe una humedad, pH y temperatura idóneos para su desarrollo. Se encuentra colonizando la mucosa del colon de forma natural, donde desarrolla funciones beneficiosas para su huésped. Muchas cepas de *E. coli* son resistentes a cierto grado de pH ácido porque necesitan pasar a través del estómago del animal para llegar al tracto intestinal. Las condiciones intestinales del huésped pueden afectar a la estructura de la población de *E. coli* y a la abundancia relativa de los distintos grupos filogenéticos de *E. coli* dependiendo del huésped y su dieta (Gordon, 2013). *E. coli* es excretada con las heces, en individuos sanos, en una concentración de $10^8 - 10^9$ unidades formadoras de colonia por gramo de heces (UFC/g).

Aunque sabemos muchas cosas sobre *E. coli* en condiciones de laboratorio, se sabe relativamente poco sobre la ecología de esta bacteria en el medio ambiente. Debido a que *E. coli* se utiliza frecuentemente como un indicador de contaminación fecal para evaluar la calidad del agua, la supervivencia y el crecimiento de *E. coli* en el medio ambiente plantea preocupaciones sobre el uso acertado de esta bacteria para indicar la contaminación fecal (Jang *et al.*, 2017). Además, dado que algunas cepas y serotipos de *E. coli* pueden causar enfermedades, la comprensión de la ecología de esta bacteria es importante para prevenir la infección y propagación de este patógeno a los alimentos, el suelo y el agua.

E. coli es un organismo modelo en microbiología. Muchos sistemas de manipulación de genes han sido desarrollados usando *E. coli* como bacteria hospedadora, produciendo innumerables enzimas y otros productos industriales.

1.3. *Escherichia coli* patogénicas

E. coli no solo incluye cepas comensales beneficiosas para el hospedador, sino que también existen cepas patógenas causantes de una variedad de enfermedades al ser humano que resultan en más de 2 millones de muertes cada año (Kaper *et al.*, 2004).

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es un problema de salud pública mundial, especialmente en los países en desarrollo, y es una de las causas principales de mortalidad en niños menores de cinco años (**Figura 1**). Los agentes etiológicos de la EDA incluyen virus, bacterias y parásitos en este orden (Farfán-García *et al.*, 2016). La bacteria *E. coli* se clasifica como un agente diarreagénico principal y se transmite principalmente al consumir agua contaminada o alimentos contaminados y poco cocinados.

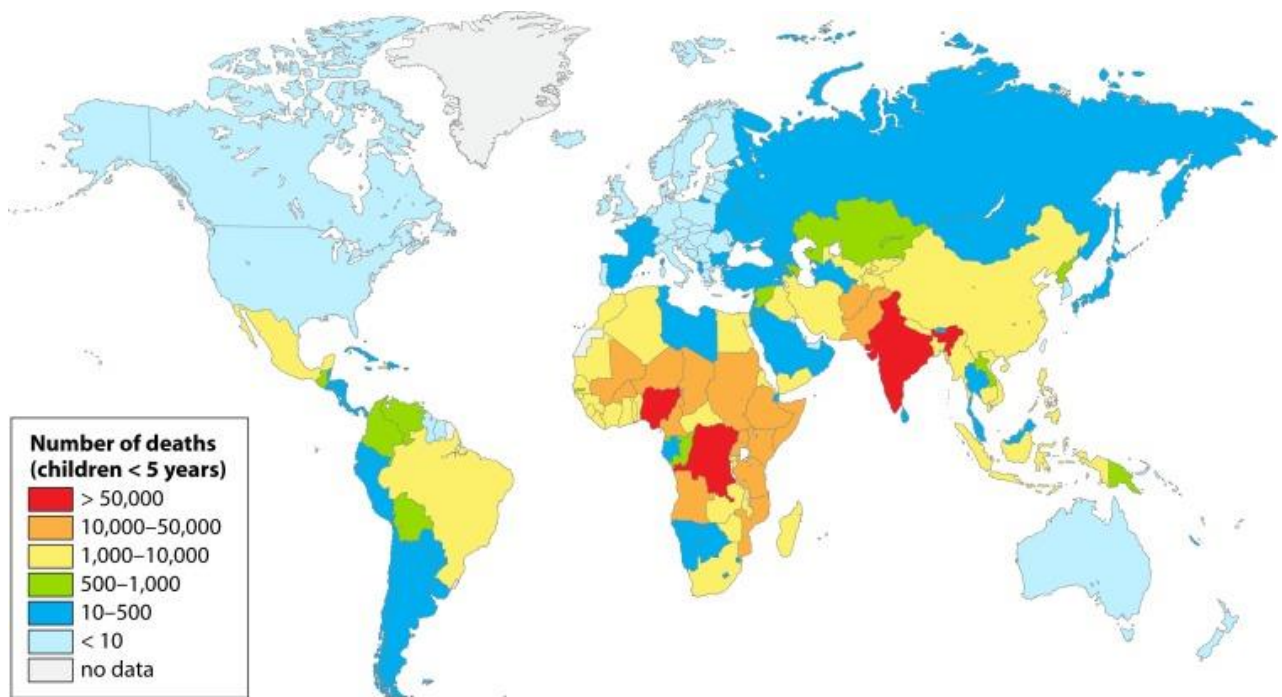


Figura 1. Mortalidad global por diarrea en niños menores de 5 años en 2010 (Croxen *et al.*, 2013).

Se han descrito varios patotipos de *E. coli* involucrados en procesos diarreicos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), recientemente se ha propuesto *E. coli* Enteroagregativa Hemorrágica (EAggHEC), y finalmente *E. coli* adherente difusa (DAEC) (Nataro and Kaper, 1998) (**Figura 2**). También se ha descrito un último tipo *E. coli* adherente invasora (AIEC) (Small *et al.*, 2013) En otro orden de clasificación, atendiendo sólo a la presencia de la toxina Shiga, podemos encontrar *E. coli* shigatoxigénica (STEC), que comentaremos más adelante.

- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC): Produce la toxina Shiga, principal factor de virulencia, capaz de causar síndrome urémico hemolítico (HUS) en el individuo infectado, y cuyo gen está localizado en el genoma de un profago.

Generalmente, EHEC posee la isla de patogenicidad LEE (*Locus for enterocyte effacement*) y forma lesiones A/E en la superficie celular. Sin embargo existen cepas EHEC LEE negativas con una alta capacidad patogénica, como por ejemplo los serotipos O91:H21, O104:H4 y O113:H21 que son capaces de causar colitis hemorrágica y HUS.

E. coli O157:H7 es el serotipo más comúnmente asociado a HUS, causando brotes epidémicos en muchos países. Sin embargo, la incidencia de STEC no-O157 está viéndose incrementada en los últimos años, principalmente los serotipos O26, O45, O103, O111, O121 y O145, conocidos como “The top 6” (Iman-Eini *et al.*, 2013).

- *E. coli* enteropatogénica (EPEC): Este patotipo fue el primero en ser identificado, y es un agente causal común de diarreas en niños menores de dos años. Suele causar brotes en guarderías y hospitales, y con el paso de los años se ha hecho prevalente en países en vías de desarrollo (Nataro and Kaper, 1998).

Los síntomas más comunes en una infección por EPEC son diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre. La dosis infectiva de EPEC para un adulto sano es aproximadamente de 10^8 microorganismos (Croxen *et al.*, 2013).

E. coli enteropatogénicas se clasifican además en EPEC típicas (tEPEC) y EPEC atípicas (aEPEC), tEPEC contienen el plásmido del factor de adherencia de *E. coli* (pEAF), y aEPEC contienen LEE pero no el pEAF (Iman-Eini *et al.*, 2013).

En general, EPEC son organismos no invasivos y no producen enterotoxinas, sin embargo son capaces de causar lesiones A/E (“*attaching and effacing*”) en la superficie del epitelio intestinal gracias a poseer una isla de patogenicidad LEE (McDaniel *et al.*, 1995). La actuación de factores de virulencia de EPEC en el epitelio celular, provocan una respuesta inflamatoria, cambios en la permeabilidad celular y la reorganización del citoesqueleto, desencadenando la diarrea acuosa (Celli *et al.*, 2000).

- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC): Uno de los agentes más frecuentes de diarrea aguda, causa la conocida como “diarrea del viajero”, que tiene lugar en individuos que viajan a países en vías de desarrollo (de la Cabada Bauche and Dupont, 2011). Es frecuente también aislarla de personas asintomáticas.

La diarrea por ETEC puede ser desde leve a causar una deshidratación grave acompañada de dolor abdominal y fiebre (Harada *et al.*, 2013). En ciertos casos puede causar cefalea y vómitos (Qadri *et al.*, 2005). La infección por ETEC suele darse por la ingestión de comida o agua contaminada, siendo 10^8 la dosis infectiva para adultos sanos (Taneja *et al.*, 2011).

Las ETEC poseen unas estructuras en su superficie denominadas “factores de colonización” (CFs), cuya función es facilitar la adhesión al enterocito en el intestino delgado. Después de la adherencia al enterocito, ETEC produce una o dos tipos de enterotoxinas, unas termolábiles (*labile toxin*: LT) y otras termoestables (*stable toxin*: ST) (Jobling and Holmes, 2012). Estas enterotoxinas son secretadas a la superficie celular, penetrando posteriormente

en el citoplasma estimulando la secreción de cloruro y electrolitos, provocando así la diarrea (Croxen *et al.*, 2013).

- **E. coli enteroinvasiva (EIEC)**: Es junto con *Shigella spp.* el agente causal de la disentería o shigelosis. Los síntomas característicos en personas infectadas son diarrea acuosa, con moco y sangre, y dolor abdominal. EIEC es más común que aparezca en brotes que en casos aislados. EIEC puede infectar tanto a niños como a adultos, pero destaca como patógeno importante en niños de menos de 6 meses (Liu *et al.*, 2012). EIEC con una dosis infectiva de 10^6 - 10^{10} posee una menor capacidad infectiva que *Shigella spp.* cuya dosis sería tan solo de 10 – 100 organismos para adultos sanos (Hsia *et al.*, 1993; Hsu *et al.*, 2010). Tanto *E. coli* enteroinvasiva como *Shigella spp.* son capaces de invadir la mucosa del colon, células M, macrófagos y células epiteliales. Ambas están íntimamente relacionadas. Actualmente se piensa que *Shigella* evolucionó de EIEC (PENG *et al.*, 2009). EIEC posee un plásmido de virulencia pINV y antígenos de invasión de plásmidos (Ipa) (Schroeder and Hilbi, 2008). Una vez en la mucosa del colon, EIEC invade una célula M y en una vacuola fagocítica la bacteria atraviesa el epitelio e invade a un macrófago. Las proteínas Ipa lisan la vacuola en el macrófago y ayudan a la bacteria a llegar al citoplasma del enterocito. Después de multiplicarse en el citoplasma, se desplaza lateralmente a otras células.
- **E. coli enteroagregativa (EAggEC o EAEC)**: Es el segundo agente causal más importante de la diarrea del viajero (solo por detrás de la ETEC). Puede producir diarrea acuosa o diarreas persistentes, más común en países en vías de desarrollo aunque también es un patotipo común en países industrializados, y causa diarreas persistentes en personas inmunodeprimidas (Okhuysen and Dupont, 2010). EAggEC se adhiere a la mucosa intestinal, la coloniza y produce un efecto citotóxico que causa diarrea acuosa sin fiebre y con secreción de moco (Mohamed *et al.*, 2007; França *et al.*, 2013). Este patotipo presenta un plásmido de virulencia llamado plásmido de adherencia agregativa (pAA), que codifica varios factores de virulencia como: fimbrias de adherencia (AFFs I-V), dispersinas (aap) que facilitan la colonización y dispersión a través de la mucosa y diversas toxinas como la termoestable (ST) de *E. coli* enteroagregativa EAST 1 y la toxina PET que tiene actividad enterotóxica y contribuye a la degradación del citoesqueleto epitelial (Navarro-García and Elias, 2011). El proceso de infección consta de tres partes, el primer paso es la expresión de las fimbrias (AAF) lo que llevará a la colonización de la mucosa intestinal. Después EAggEC produce un biofilm de moco por la superficie del enterocito y finalmente las toxinas causan la respuesta inflamatoria y la secreción intestinal. Desencadenando la diarrea acuosa con moco y el dolor abdominal (Pereira *et al.*, 2008). En los últimos años ha aparecido por todo el mundo el problema, cada vez mayor, de EAggEC resistentes a antibióticos (Aslani *et al.*, 2011). Algunas cepas EAggEC pueden adquirir el gen *stx* de la toxina Shiga aumentando así su grado de virulencia (Morabito *et al.*, 1998) y convirtiéndose en un nuevo patotipo, que se ha propuesto denominar *E. coli* Enteroagregativa Hemorrágica (**EAggHEC**).

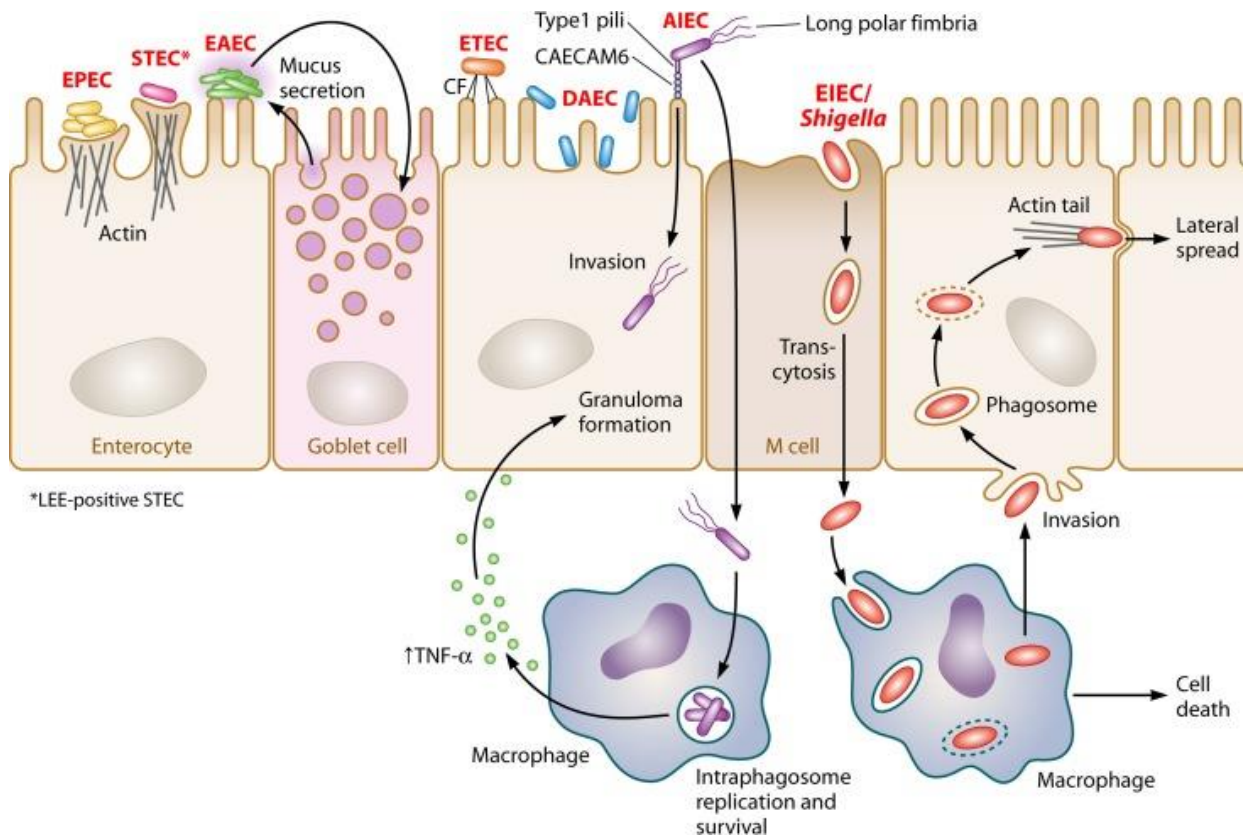


Figura 2. Patrones de adherencia de los distintos patotipos patógenos de *E. coli* (Croxen *et al.*, 2013).

- ***E. coli* de adherencia difusa (DAEC):** Estas cepas se asocian a diarrea aguda o persistente en niños fundamentalmente. En adultos es más común su presencia asintomática. No se conoce demasiado de sus mecanismos de patogenicidad pero las principales características de DAEC son (Farfán-García *et al.*, 2016):

- La unión mediante adhesinas a la mucosa intestinal.
- Formación de microcolonias apiladas.
- Producción de citotoxinas y enterotoxinas.
- Desarrollo de una inflamación grave de la mucosa.

Las cepas DAEC expresan adhesinas afimbriales (Afa) y adhesinas fimbriales (Dr) en la superficie de la membrana externa bacteriana (Le Bouguéneq *et al.*, 2001; Hudault *et al.*, 2004). Al originarse la unión de la bacteria al enterocito por medio de estas adhesinas, se produce una elongación de las microvellosidades (Bilge *et al.*, 1989). Tras la elongación, las DAEC producen daño y reordenamiento de las proteínas del citoesqueleto del enterocito, generando un aumento en la permeabilidad, y provocando la diarrea (Bétis *et al.*, 2003).

- ***E. coli* adherente invasora (AIEC):** La *E. coli* adherente invasora (AIEC) ha sido descrita como uno de los agentes causantes de la enfermedad de Crohn (EC), que es una enfermedad inflamatoria intestinal que afecta principalmente al intestino delgado. No existe un único agente causante de EC identificado, y la hipótesis actual es que es causada por una combinación de factores, incluyendo la genética, la microbiota intestinal, factores ambientales y los patógenos entéricos (Small *et al.*, 2013).

El patotipo AIEC posee la capacidad de adherirse e invadir las células epiteliales y células M, replicándose dentro de las células epiteliales y macrófagos. En cuanto a la invasión, la AIEC se desplaza a través de flagelos, y puede adherirse por medio de una adhesina FimH al enterocito o bien adherirse a una célula M por medio de una fimbria polar larga (LFP) (Chassaing *et al.*, 2011). Una vez dentro de la célula M la AIEC es fagocitada por un macrófago donde se replica dentro de fagosomas (al igual que las EIEC), lo que aumentará la inflamación y la patología.

- *E. coli* shigatoxigénica (STEC o VTEC): Esta clasificación, que no corresponde a uno de los patotipos arriba indicados, incluye cualquier *E. coli* que porte el gen *stx* que produce la toxina Shiga o toxina Stx o Verotoxina (Vtx) (toxina que le da nombre al patotipo STEC o VTEC). Puede incluir cualquier patotipo, pero es más común la presencia de la *stx* en cepas EHEC, EPEC, o como se ha descrito recientemente, también se encuentra en cepas EAggEC.

En general, *E. coli* posee una enorme plasticidad genotípica, pudiendo adquirir nuevos factores de virulencia y resistencias a diversos fármacos por medio de Elementos genéticos móviles (*Mobile genetic elements*; **MGE**). De esta forma, una *E. coli* comensal e inofensiva podría transformarse en uno de estos patotipos por medio de la adquisición de genes (**Figura 3**).

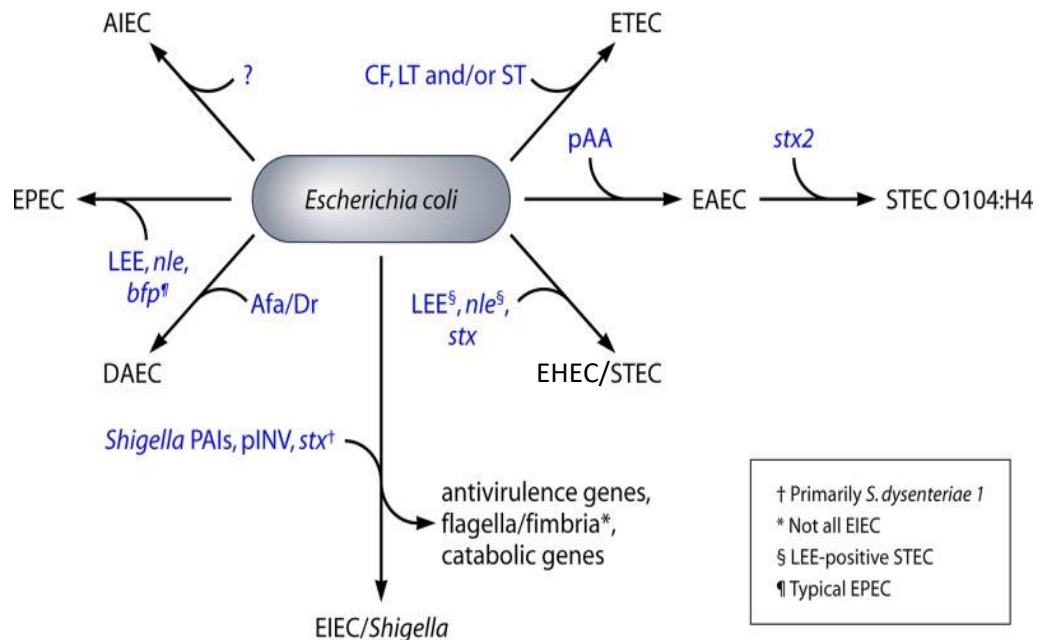


Figura 3. Adquisición y pérdida de genes de virulencia para los diferentes patotipos (Croxen *et al.*, 2013).

1.4. *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC)

Las STEC producen una o más toxinas Shiga (Stx) muy similares a la que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que se las denomina toxinas shiga-like, shigatoxinas (O'Brien and LaVeck, 1983). También se las conocen como verotoxinas y a las cepas como *E. coli* verotoxigénica (VTEC), debido al efecto citotóxico de la toxina sobre las células vero (Konowalchuk *et al.*, 1977).

Por su capacidad de producir toxina Stx, STEC puede causar dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y poca fiebre. También puede derivar en enfermedades más graves como la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (*Hemolytic uremic syndrome*; HUS). En el caso de la colitis, la enfermedad puede progresar a colitis gangrenosa, peritonitis y sepsis (Canpolat, 2015), mientras que en el caso del HUS, puede producir anemia hemolítica, púrpura trombótica trombocitopenica (PTT), fallo renal e incluso la muerte (Nguyen and Sperandio, 2012).

1.4.1. Transmisión, reservorio y fuentes de contagio

La transmisión de STEC es fecal-oral y la dosis infectiva se cree que es extremadamente baja, aunque esta estimación es complicada debido a la capacidad de STEC de estar en forma viable pero no cultivable cuando están en condiciones de estrés ambiental y al hecho de que diversos patotipos de *E. coli* pueden ser STEC. STEC viables pero no cultivables han sido encontradas en comida y han sido capaces de producir la toxina Shiga (Dinu and Bach, 2011) y si bien son capaces de generar la infección si son ingeridas, no crecen bien en medios de cultivos establecidos, por lo que su presencia esta subestimada y puede pasar desapercibida.

Los animales rumiantes como el ganado son ampliamente reconocidos como los principales reservorios de STEC, particularmente de cepas EHEC, y la exposición a su materia fecal representa una importante fuente de enfermedades humanas (Gyles, 2007). Un estudio con carne de vacuno en Estados Unidos demostró que el 24% de las muestras eran positivas para los genes *stx* por PCR, pero sólo una pequeña proporción de aislamientos era potencialmente patógena para los seres humanos (Bosilevac and Koohmaraie, 2011). Además de en los rumiantes, STEC O157:H7 ha sido aislada de otros animales como cerdos, ovejas, ciervos, jabalíes, conejos, pájaros, perros e incluso insectos (Ferens and Hovde, 2011).

La exposición por contacto directo con animales o con sus heces en zoológicos y granjas es una importante vía de exposición a STEC. Se estima que el contacto con animales constituye el 8% de las enfermedades por STEC no O157 y el 6% por STEC O157:H7 en los Estados Unidos (Hale *et al.*, 2012). Un estudio realizado en Escocia mostró que las heces de ganado pueden contener de 100 a más de 10⁶ unidades formadoras de colonia (UFC) de STEC O157: H7 por gramo de heces (Chase-Topping *et al.*, 2007). Se ha demostrado que STEC sobrevive en el suelo durante varios meses y al menos tres semanas en heces de animales de granja, incluidas las de ganado vacuno y porcino (Strachan *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008).

Los alimentos y el agua contaminados son el origen de muchos brotes esporádicos y epidemias debidas a STEC. En los Estados Unidos, se estima que el 68% de las enfermedades por O157: H7 y el 82% de las enfermedades por STEC no-O157 están relacionados con los alimentos (Scallan *et al.*, 2011). La carne puede contaminarse a través del contacto con heces durante el sacrificio o el procesamiento, mientras que las hortalizas pueden contaminarse mediante el uso de estiércol como abono o a través de agua de riego contaminada (Solomon *et al.*, 2002).

En cuanto a la transmisión persona-persona se le atribuye la causa del contagio en un 19 % de los casos de brotes con O157:H7 (Snedeker *et al.*, 2009).

1.4.2. Factores de virulencia

Toxina Shiga (Stx)

Esta toxina es el principal factor de virulencia de STEC, y es la principal responsable de HUS. Todas las toxinas Shiga comparten características estructurales y enzimáticas; sin embargo, existen diferencias con respecto a la secuencia, la actividad biológica y la reactividad serológica (Krüger and Lucchesi, 2015). Las toxinas Shiga de *E. coli* se clasifican en dos tipos principales: Stx1 y Stx2. Cada grupo comprende varios subtipos, siendo el tipo Stx2 más heterogéneo que el Stx1. La toxina Shiga puede clasificarse en: Stx1 (3 subtipos a, c y d) y Stx2 (7 subtipos del a al g) (Scheutz *et al.*, 2012). Es posible correlacionar Stx2a como la toxina más virulenta y la responsable de más casos de HUS producidos. En cambio Stx2e, Stx2f y Stx2g están asociadas a baja patogenicidad en humanos. En un estudio de la potencia de las toxinas Stx purificadas (Fuller *et al.*, 2011) se encontraron diferencias tanto en condiciones in vitro como in vivo. En particular, Stx2a y Stx2d demostraron ser más potentes que Stx2b, Stx2c y Stx1.

STEC puede llevar un solo tipo de Stx, ambos tipos o incluso una combinación de diferentes subtipos. Tanto Stx1 como Stx2 son capaces de producir HUS tras una infección, sin embargo Stx2 está más estrechamente relacionado con la producción de HUS y daño grave en el paciente (Boerlin *et al.*, 1999).

La toxina Stx está formada por las subunidades A y B. La subunidad A presenta una función enzimática inhibiendo la síntesis proteica de la célula eucariota mientras que la subunidad B da lugar a cinco unidades encargadas de la unión a la célula, generalmente al receptor Gb3 (**Figura 4**).

El ingreso de la toxina a la célula y la distribución hacia diferentes órganos es mediado por tres mecanismos principales:

- Endocitosis: Se da tras la unión entre las subunidades B y el receptor Gb3, la subunidad A se introduce en el citoplasma mediante invaginación de la membrana celular (Lee *et al.*, 2005).

- **Macropinocitosis (MPC):** Permite la entrada de Stx cuando el receptor de las membranas (Gb3) no es expresada por la célula.
- **Transcitosis:** La toxina es capaz de pasar de un espacio extracelular a otro mediante vesículas. Facilita la propagación de la toxina hacia otras células endoteliales que expresen el receptor Gb3 (In *et al.*, 2013).

Una vez que Stx se introduce en la célula, la subunidad A de la toxina Stx interacciona con el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. La subunidad A es una RNA-glicosidasa que elimina una adenina del rRNA 28S, inhibiendo así la síntesis de proteínas y causando la muerte celular. Los mecanismos de cómo las toxinas Shiga causan la muerte celular son muy complejos (Tesh, 2012).

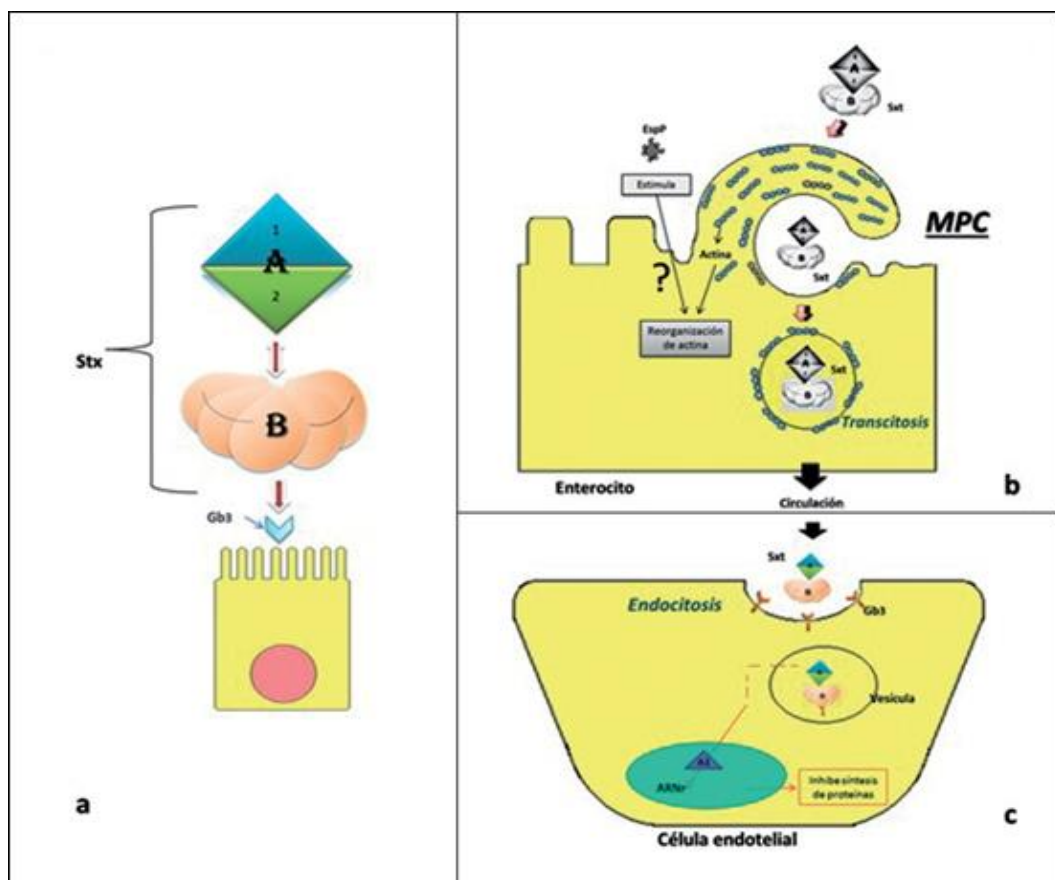


Figura 4. a. La toxina Shiga está compuesta por una subunidad A con actividad enzimática y una subunidad B encargada de la unión al receptor Gb3 de la célula hospedadora. b. En ausencia de Gb3 se produce una reorganización de actina que permite la entrada de Stx al enterocito por medio de la macropinocitosis (MPC). c. La subunidad B se une al receptor Gb3 y permite la entrada a la célula de la toxina, donde la subunidad A bloqueará la síntesis de proteínas produciendo la muerte celular. (Farfán-García *et al.*, 2016).

Tanto Stx1 como Stx2 están codificados en profagos dentro del cromosoma bacteriano. Los bacteriófagos portadores de la toxina Shiga pueden activar su ciclo lítico bajo condiciones de estrés ambiental para la bacteria, llevando a la lisis bacteriana y a la diseminación de los propios fagos Stx (Neely and Friedman, 1998). Los fagos Stx se describen en detalle más adelante.

Otros factores de virulencia

Existen en las STEC otros importantes factores de virulencia:

- Otras toxinas como la “cytolethal distending toxin” (**Cdt**) o la enterohemolisina (**HlyA**). La Cdt puede encontrarse en muchas cepas de *E. coli* y en estas está asociada con ciertos tipos de fagos (Friedrich *et al.*, 2006). Una vez en la célula, Cdt se activa enzimáticamente produciendo alargamiento de la célula y daño en el ADN. Algunas Cdt son capaces de causar daño en el epitelio y contribuir al HUS. La HlyA, codificada en el plásmido pO157, lisa los hematíes para permitir la obtención del hierro a partir de los grupos hemo.
- Factores necrotizantes. Estos factores provocan en la célula alargamiento y multinucleación (Orden *et al.*, 1999). Se han descrito 3 tipos de factores necrotizantes, CNF1, CNF2 y **CNF3**, este último es patógeno en humanos. Las *E. coli* que presentan estos factores se las conocen como NTEC, observándose dichos factores en distintas cepas STEC.
- Autotransportadores. La mejor estudiada en STEC es la proteasa multifuncional **EspP**, que inhibe el factor de coagulación V, evitando que se detenga la hemorragia (Brunder *et al.*, 1997).
- STEC LEE positivas. Estas cepas forman lesiones A/E similares a las formadas por EPEC. Numerosas adhesinas son codificadas en la isla de patogenicidad LEE, contribuyendo a la colonización del epitelio y a las superficies de los alimentos.
Se ha demostrado que fimbrias tales como la fímbria de unión a la laminina de *E. coli* (**ELF**) y la fímbria polar larga (**Lpf**) se unen a la matriz extracelular (Farfan *et al.*, 2011) (Samadder *et al.*, 2009). El pili hemorrágico de *E. coli* (**HCP**) es un pili de tipo IV encontrado en STEC O157:H7 que forma fibras empaquetadas largas que pueden unirse a las proteínas de la matriz extracelular en las células epiteliales (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2007).
- Adhesina aglutinante de STEC (**Saa**). Se encuentra en cepas STEC LEE negativas. No todas las cepas STEC que causan HUS son LEE positivas. Varias cepas LEE negativas han sido aisladas de pacientes con HUS, como los serotipos O91:H21 (Ito *et al.*, 1990), O104:H4 (Frank *et al.*, 2011), y O113:H21 (Paton *et al.*, 1999). Se han identificado varias adhesinas únicas para cepas LEE negativas, la más importante es la adhesina aglutinante de STEC (**Saa**) que se localiza en la superficie de la membrana externa bacteriana, quedando expuesta a la superficie celular eucariota.

1.4.3. *E. coli* O104:H4. Una nueva cepa emergente extremadamente virulenta

En mayo de 2011, un brote causado por *E. coli* serotipo O104:H4 se extendió por toda Alemania, principalmente por la ciudad de Hamburgo. Un mes después, en Junio, en Francia se registraron casos de infección por *E. coli* O104:H4 (Gault *et al.*, 2011).

En Alemania fueron reportados un total de 3816 casos (incluidas las 54 muertes), de los cuales 845 (22%) presentaron síndrome urémico hemolítico (HUS). La mayoría de afectados fueron adultos de mediana edad (88%) y de sexo femenino (68%). Se estimó un periodo de incubación de 8 días con 5 días entre la aparición de la diarrea y el desarrollo de HUS (Frank *et al.*, 2011).

Datos epidemiológicos indican que la fuente de contagio fue una partida de brotes de fenogreco importados de Egipto, aunque no está del todo confirmado ya que no pudo aislarse ninguna *E. coli* O104:H4 de estos productos.

El brote fue causado por una cepa de *E. coli* inusual con características muy similares a las de *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) serotipo O104:H4. La principal diferencia entre una EAggEC y el agente causal del brote, es que este último llevaba en su cromosoma un profago con el gen *stx* que codifica la toxina Shiga (Bielaszewska *et al.*, 2011; Rasko *et al.*, 2011). La combinación de características tanto de EAggEC como de EHEC, representa un nuevo patotipo especialmente virulento, que se ha propuesto llamar *E. coli* enteroagregativa-hemorrágica (**EAggHEC**) (Figura 5).

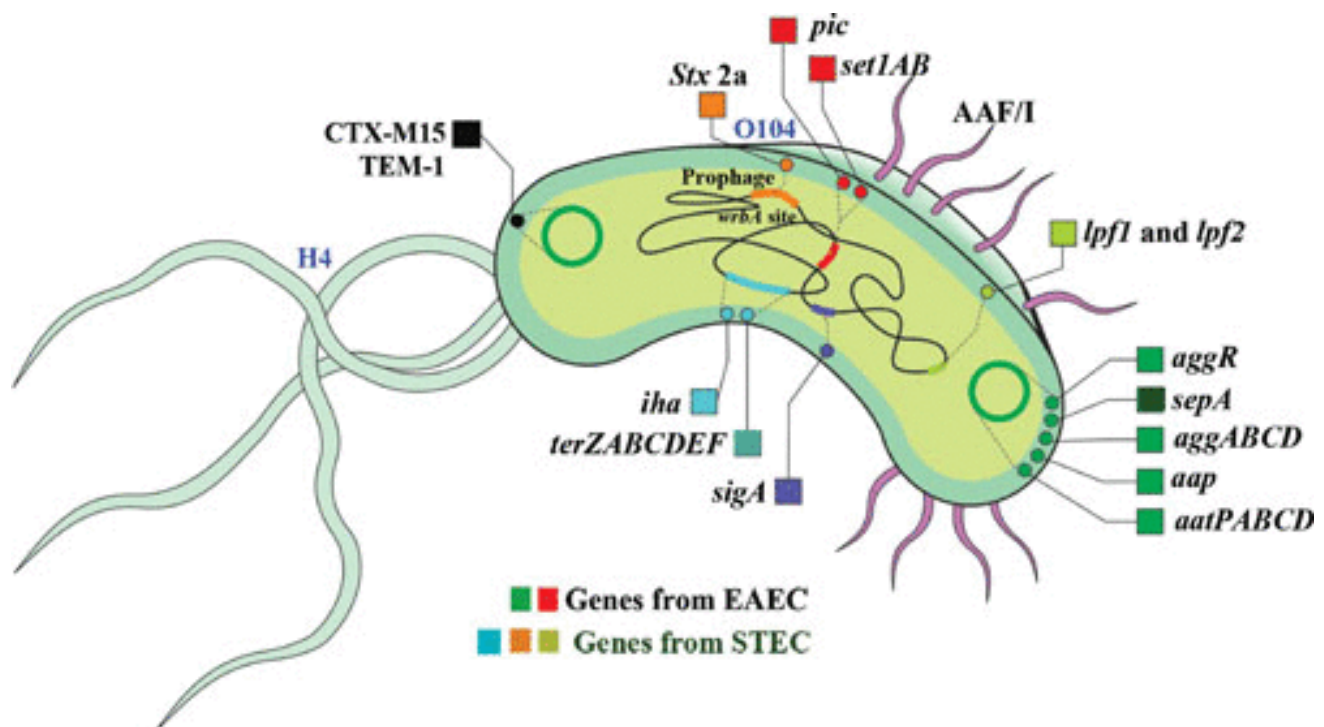


Figura 5. *E. coli* O104:H4 responsable del brote de Alemania y Francia en 2011, con características de EAggEC y STEC. Los genes *stx2*, *pic*, *sigA*, *sepA*, *set1AB* y *iha* codifican respectivamente para: la toxina Stx2, Pic facilita la colonización intestinal, SigA posee actividad citotóxica, SepA es un factor de colonización de *Shigella sp*, ShET es una holotoxina y Iha es una adhesina típica de STEC. Los genes *aggR*, *aggABCD*, *aap* y *aatPABCD*, son genes de virulencia de una plásmida característico de EAggEC. El gen *lpf* 1-2 codifica la proteína Lpf característica de STEC y finalmente *terZABCDEF* codifica para resistencia a telurito y *CTX-M15* y *TEM-1* son genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos. (Navarro-García, 2014).

No se encontraron evidencias de *E. coli* O104:H4 en heces de ganado en el norte de Alemania, así como tampoco se encontró dicho serotipo en el ganado francés (Wieler *et al.*, 2011; Auvray *et al.*, 2012). La identificación reciente de casos esporádicos de HUS en Francia de clones similares al responsable del gran brote de 2011 sugiere que el patógeno O104:H4 se ha establecido endémicamente en Europa y es muy probable que en la población humana (Monecke *et al.*, 2011).

Una cuestión esencial es saber el motivo principal por el que esta cepa O104:H4 es tan peligrosa. Una explicación es que esta cepa (en resumen, una EAggEC con un fago que codifica para Stx2) es una gran colonizadora del intestino. La mayor adherencia de esta cepa a las células epiteliales intestinales podría facilitar la absorción sistémica de Stx y podría explicar la alta frecuencia de progresión a HUS (22% frente al 5-10% habitual en cepas EHEC). Se cree que la EAggEC del serotipo O104:H4 es por sí misma una cepa emergente que ha adquirido un conjunto amplio de factores de virulencia.

1.5. *E. coli* y la resistencia a antibióticos

Dado que *E. coli* reside comúnmente en el intestino de animales de sangre caliente, está sometida a frecuentes encuentros con antibióticos, por lo que se ve expuesta a una alta presión selectiva que conduce a la adquisición de resistencia contra los antibióticos consumidos por su huésped (Looft *et al.*, 2012).

En los ambientes naturales, como el agua, el suelo, las aguas residuales o los lodos, se produce un constante intercambio genético entre las diversas bacterias, y del mismo modo, el intercambio genético también puede ocurrir en el intestino (Baquero *et al.*, 2008).

Los genes que codifican resistencia a los antibióticos se asocian con frecuencia a elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones o bacteriófagos, que pueden movilizar estos genes incluso entre bacterias pertenecientes a diferentes líneas filogenéticas (Wellington *et al.*, 2013).

Se ha demostrado la existencia de diversas cepas de *E. coli* multirresistentes a antibióticos aisladas de ambientes naturales relacionados con la actividad humana. De hecho es común que algunas cepas patógenas de *E. coli* y resistentes a antibióticos puedan contaminar campos de cultivo y verduras debido al uso de estiércol animal o lodos de depuradora como fertilizantes (Yang *et al.*, 2010). La presencia de cepas resistentes conlleva un alto riesgo para la salud pública (Dhanji *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2013).

1.6. Resistencia a antibióticos

La aparición de resistencias a antibióticos es un proceso natural e inevitable. Los microorganismos siempre han desarrollado estrategias para colonizar nuevos nichos, competir con otros microorganismos y sobrevivir. Los antibióticos no han sido inventados por los humanos, sino que son producidos por microorganismos y llevan presentes en el planeta desde hace muchos millones de años (Martinez, 2008).

Alexander Fleming (1881-1955) enfatizó que el uso indiscriminado de la penicilina conduciría a un rápido desarrollo de la resistencia (Fleming, 1945). Pronto se identificó la producción de penicilinas, una enzima producida por los estafilococos, anteriormente sensibles, que inactiva la penicilina, para revisión (Galán *et al.*, 2013). La bacteria penicilina-resistente *Staphylococcus aureus* apareció tan pronto la penicilina fue introducida en los hospitales de Londres en la década de 1940 (Levy, 1998; Levy and Marshall, 2004). Así comenzó una carrera que se perdió desde el inicio.

Durante casi siete décadas, la humanidad ha aprovechado el beneficio de los antibióticos como antimicrobianos. Hoy en día, la gran mayoría de los procesos infecciosos se resuelven con tratamiento antibiótico, pero cada vez es más común encontrar ejemplos de nuevas cepas resistentes a diversos antibióticos. El incremento de estas resistencias es tal, que la organización mundial de la salud (OMS) ha calificado el problema como “emergencia mundial” (Hidron *et al.*, 2008; Otter and French, 2011). En su plan de acción contra las resistencias a antibióticos, la OMS ha activado un protocolo a seguir a nivel mundial con las siguientes recomendaciones: generar y compartir información epidemiológica, implementación de medidas de prevención de infecciones, optimización del uso humano de antibióticos y restricciones al uso de antibióticos como agentes promotores del crecimiento en el ganado. Evidentemente, medidas drásticas tienen que ser implementadas, porque si no lo hacemos, pronto estaremos viviendo en la "era post-antibióticos", para revisión consultar (Ponce de León-Rosales *et al.*, 2015).

1.6.1. La diseminación ambiental de antibióticos y la propagación de microorganismos resistentes

El problema no termina en la entrada del hospital o en la puerta de la granja. El medio ambiente es una fuente enorme de resistencia a los antibióticos. En condiciones naturales, los efectos que los antibióticos producen en un ecosistema, ocurren a concentraciones muy bajas. Sin embargo, incluso concentraciones muy bajas de antibióticos son suficientes para proporcionar ventajas selectivas a los microorganismos resistentes frente a los no resistentes (Gullberg *et al.*, 2011). El entorno natural alberga un reservorio muy diverso de determinantes de resistencia, incluyendo genes de resistencia a antibióticos (**ARGs**) y elementos genéticos móviles que actúan como vectores para su movilización.

Desde el comienzo de la era antibiótica en la primera mitad del siglo XX, los antibióticos y los ARGs se han extendido a casi todos los ecosistemas del planeta. El aumento de los niveles de genes de resistencia a los antibióticos en el suelo agrícola (Knapp *et al.*, 2010) o en las aguas superficiales demuestran el papel del uso humano de los antibióticos en la difusión de las resistencias. Otro aspecto importante es la selección de la resistencia a los antibióticos por la presencia de metales pesados o biocidas que también se introducen antropogénicamente en el medio ambiente.

El ciclo de vida de los antibióticos usados farmacéuticamente no termina cuando un paciente traga una píldora o cuando se trata al ganado. En la mayoría de los casos, los antibióticos se excretan al medio con las heces. Por ejemplo para algunas clases de antibióticos altamente consumidos, como beta-lactámicos, tetraciclinas, vancomicinas, quinolonas, fenicoles y trimetoprim, la excreción generalmente excede el 50% de la dosis administrada. Los antibióticos y sus metabolitos, excretados por los pacientes, pasan por el sistema de alcantarillado a las plantas de tratamiento de aguas residuales (**EDAR**). Sin embargo, el tratamiento de la EDAR no es suficiente para eliminar todos los residuos farmacéuticos, incluidos los antibióticos. Por lo tanto, una parte de los antibióticos abandonan la EDAR y llegan a ríos y lagos o forman parte de los lodos de depuradora y se introducen en el medio ambiente cuando el lodo se utiliza como fertilizante (**Figura 6**).

Además, los excrementos de los animales domésticos, junto con las aguas residuales generadas al lavar los establos, terminan en tanques de almacenamiento de estiércol que suele ser usado como fertilizante en los campos de cultivo. El consumo de estas verduras, especialmente las que se consumen crudas, exponen a los seres humanos a estos microorganismos, contribuyendo a la propagación de la resistencia (Marti *et al.*, 2013).

Por último, hay que contar con los antibióticos que entran en el medio acuático directamente desde las instalaciones de producción farmacéutica y de las aguas procedentes de piscifactorías. Estas emisiones pueden ser considerables (Harnisz *et al.*, 2015).

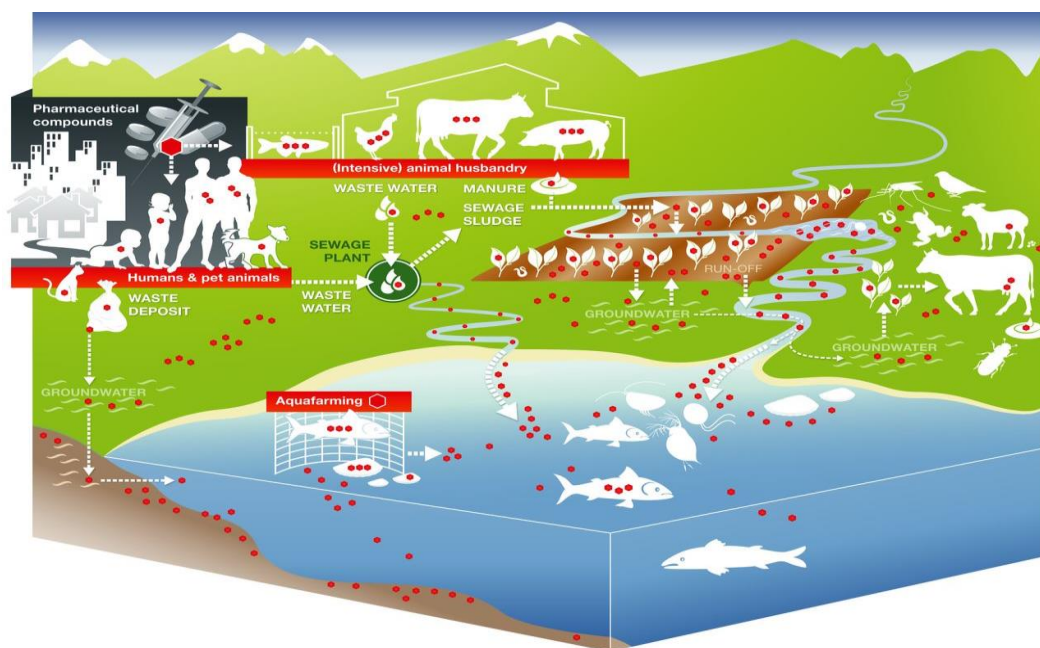


Figura 6. Vías de diseminación de antibióticos por el medio ambiente. Los residuos de antibióticos se representan simbólicamente como puntos rojos (Berkner *et al.*, 2014).

1.6.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos

Las bacterias han podido desarrollar resistencia a los antibióticos mediante diversos mecanismos (Finley *et al.*, 2013):

- Cambios de permeabilidad en la pared celular dificultando el acceso a los antibióticos a su diana.
- Bombeo activo del antibiótico al exterior de la bacteria.
- Modificación enzimática del antibiótico.
- Degradación del antibiótico.
- Activación de rutas metabólicas alternativas de aquellas inhibidas por el antibiótico.
- Modificación de la diana del antibiótico.
- Sobreproducción del enzima diana.

Estos mecanismos de resistencia pueden ser:

La resistencia intrínseca tiene lugar de manera natural en la mayoría de las cepas de una especie y están codificadas en el cromosoma bacteriano (por ejemplo las bacterias Gram-negativas son resistentes a vancomicina). La resistencia intrínseca es un fenómeno inherente a las bacterias, anterior al uso de los antibióticos por el ser humano y es por tanto independiente de la presión selectiva (D'Costa *et al.*, 2006; Dantas *et al.*, 2008).

La resistencia adquirida es el resultado de mutaciones en el ADN o de adquisición de ADN exógeno mediante transferencia genética horizontal (*Horizontal gene transfer*; **HGT**) (desarrollado en el capítulo "Movilidad de factores de virulencia y resistencia a antibióticos").

1.6.3. Genes de resistencia a antibióticos

Los genes de resistencia adquiridos, pueden permitir que una bacteria produzca enzimas que destruyan el fármaco antibacteriano, expresen sistemas de eflujo que eviten que el fármaco llegue a su objetivo intracelular, modifiquen la diana del fármaco o produzcan un camino metabólico alternativo que evite la acción del antibiótico.

Entre los antibióticos más utilizados a nivel global se encuentran los β -lactámicos, debido a su gran eficacia y poca toxicidad. La resistencia a estos β -lactámicos es conferida por genes que codifican β -lactamasas o proteínas de unión a la penicilina. Entre los diversos genes, en este estudio nos hemos centrado en β -lactamasas bla_{TEM} y bla_{CTX-M} , cuya presencia en el medio ambiente es muy numerosa y confieren protección a las enterobacterias (Colomer-Lluch, Jofre, *et al.*, 2011). Otro gen que hemos estudiado es el gen *mecA* que codifica una proteína de unión a penicilina y da protección a los *Staphylococcus spp* frente a este tipo de antibióticos. MecA es una resistencia de gran relevancia

debido a los elevados problemas sanitarios que generan los **MRSA** (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) (Colomer-Lluch, Imamovic, *et al.*, 2011).

Entre otros genes de resistencia de gran relevancia, en este estudio también se han evaluado genes que confieren resistencias a los aminoglucósidos en Gram negativos, como el gen *armA*, que mediante la metilación del ARNr 16S, otorga a la bacteria portadora, resistencia a los antibióticos 4, 6-deoxiestreptaminas (kanamicina y gentamicina entre otras) y a la fortimicina (Galimand *et al.*, 2005).

También se estudiaron genes de resistencia que proporcionan una menor susceptibilidad a las quinolonas, como *qnrA* y *qnrS*. Estos genes codifican proteínas Qnr que realizan un efecto de protección sobre la ADN girasa y la topoisomerasa IV (dianas de las quinolonas), disminuyendo sustancialmente el efecto de las quinolonas sobre la bacteria, evitando el bloqueo de la síntesis del ADN (Jacoby *et al.*, 2008). Los genes *qnr* se han descrito en todo el mundo en diversas especies de enterobacterias, y generalmente se encuentran asociados a elementos genéticos móviles (Cambau *et al.*, 2006).

1.7. Movilidad de factores de virulencia y resistencias a antibióticos

Esta movilidad tiene lugar por transferencia horizontal de genes (HGT), y genera un tremendo impacto en la plasticidad del genoma, la adaptación y la evolución de las bacterias. La HGT está mediada por **MGE** tales como plásmidos, islas de patogenicidad, transposones y bacteriófagos. Los MGE transferidos horizontalmente participan en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos y genes de virulencia, contribuyendo así a la aparición de nuevas especies bacterianas con mayor potencial patogénico. Estudios recientes han revelado que aproximadamente el 75% de los genes en cada genoma bacteriano se han adquirido por transferencia horizontal de genes durante la evolución (Kloesges *et al.*, 2011).

Las bacterias patógenas se encuentran entre las principales agentes causales de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En los últimos años han surgido varias cepas bacterianas multirresistentes y / o hipervirulentas como resultado de la adquisición horizontal de genes de resistencia a antibióticos y virulencia, que causaron brotes graves no solo en hospitales, sino también en otros entornos entre individuos sanos (Juhás, 2015).

Los principales mecanismos para transferir genes horizontalmente entre las bacterias son la transformación, la conjugación, y la transducción (**Figura 7**).

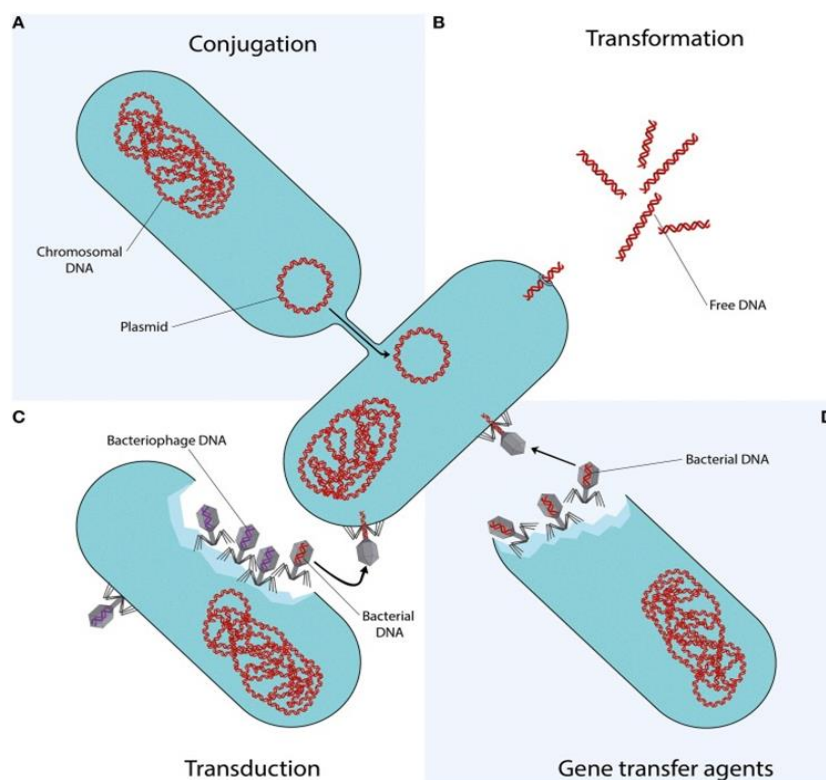


Figura 7. Mecanismos de transferencia horizontal de genes (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

- **Transformación:** La transformación natural es un proceso que implica la adquisición simple por una bacteria de ADN libre en el ambiente y su posterior expresión en la célula receptora. Para algunas bacterias, la transformación es inducida por condiciones ambientales específicas, mientras que otras son siempre "competentes" para dicha transformación. El transporte de ADN durante la transformación es un proceso complejo que implica varias estructuras, como los sistemas de secreción tipo II (T2SS), sistemas de secreción de tipo IV (T4SS) y el tipo pili IV (Krüger and Stingl, 2011). La transformación también puede ser artificial, produciéndose en el laboratorio las condiciones para que la bacteria incorpore ADN exógeno.
- **Conjugación:** Es la transferencia directa de ADN de una célula bacteriana a otra. La conjugación implica la síntesis de una estructura llamada "pili conjugativo" que permite unir a la donante con la receptora, lo que las lleva a un contacto directo de célula a célula. Este ADN donado suele ser en forma de plásmido, es decir, 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. Además pueden ser únicos o multicopia dentro de la misma bacteria. La conjugación es el principal mecanismo en la transferencia de plásmidos portadores de ARGs entre las bacterias. Algunos elementos diferentes de los plásmidos usan la conjugación para moverse, es el caso de los ICE (García-Aljaro *et al.*, 2017).
- **Transducción:** El ADN se transfiere por medio de los bacteriófagos (tal como se comenta más adelante), que por sí mismos son un mecanismo esencial de diseminación horizontal de genes. Pueden actuar movilizándose ellos mismos y también pueden facilitar la transferencia de otros elementos genéticos móviles, como es el caso de las islas de patogenicidad (***Pathogenicity island: PAI***) (Muniesa *et al.*, 2006; Konczy *et al.*, 2008). Aunque algunas PAI han demostrado ser movilizadas por fagos, como las islas de patogenicidad de *S. aureus* (***SaPIs***) (Mir-Sanchis *et al.*, 2012), no todas las islas de patogenicidad son móviles, como ocurre con LEE, que generalmente no se moviliza (Muniesa *et al.*, 2006).
- **Transposición:** Los elementos transponibles (**TE**) son segmentos lineales de ADN que se distinguen por su capacidad de moverse y replicarse dentro de un genoma. Un TE recurre a la transposición a lo largo del genoma, que resulta ser un tipo especial de recombinación donde una secuencia de ADN puede migrar a un locus no homólogo. La transposición puede ser clasificada además como conservadora (causa solo inserción) o replicativa (causa la replicación del ADN e inserción de la réplica en un nuevo locus) (Mit'kina, 2003). Los TEs causan reordenamientos genómicos, mutaciones o duplicaciones. Los más comunes son los transposones simples o elementos de inserción (**IS**), que están constituidos por una cadena corta de ADN (de 2,5 a 60 kb), que contiene un gen necesario para la transposición que se denomina transposasa, flanqueado por secuencias repetidas invertidas. Los transposones a menudo contienen genes, incluidos aquellos para la resistencia a los medicamentos (Patel, 2016). Aunque en principio la transposición no implica movimiento entre células, si el transposon se incorpora en un plásmido, elemento conjugativo o fago, este puede ser posteriormente movilizado a otra célula bacteriana.

1.7.1. Transferencia horizontal de genes (HGT) en *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria extremadamente versátil cuyo genoma presenta una amplia plasticidad. El genoma de las cepas patógenas puede tener hasta 1 Mb más de información que las cepas no patógenas. Este incremento de información genética es debido a la adquisición horizontal de DNA por medio de MGE (Ogura *et al.*, 2007; Rasko *et al.*, 2008).

Por mostrar un ejemplo, el análisis de la secuencia de la cepa enterohemorrágica O157:H7 Sakai O157 reveló 24 profagos en su genoma, codificando una amplia variedad de factores de virulencia (Tobe *et al.*, 2006; Juhas, 2015). Al contrario de lo que se pensaba anteriormente, estos profagos no son antiguos vestigios inactivos de evolución, sino que son capaces de replicar, recombinar e infectar otras bacterias (Asadulghani *et al.*, 2009).

Volviendo a la cepa O104:H4 causante del brote de Alemania en 2011, su gran patogenicidad fue muy probablemente el resultado de dos factores de transferencia horizontal combinados. Por un lado la adquisición de la toxina Shiga por medio de un bacteriófago y por otro lado la adquisición de genes de resistencia (β -lactamasas TEM-1 y CTXM-15) por medio de plásmidos, lo que le permitió vencer en la competencia con las bacterias comensales después del tratamiento con antibióticos (Bielaszewska *et al.*, 2011). En efecto, las cepas de *E. coli* (patógenas o comensales) pueden actuar como reservorio de genes de resistencia a antibióticos y facilitar la difusión de estos en entornos donde pueden existir otras *E. coli* (Valverde *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2013).

1.8. Bacteriófagos

Se conocen como bacteriófagos o fagos a todos los virus cuyos únicos hospedadores son las bacterias. El nombre bacteriófago proviene de los términos “bacteria” y “phagetón” cuyo significado en griego es devorar, ingerir. Fueron descubiertos en la segunda década del siglo XX por Twort (1915) y D’Herelle (1917). La capacidad de los fagos para infectar bacterias llevó a D’Hérelle a examinar su potencial terapéutico contra la infección bacteriana. Incluso en su primer artículo, señaló que la presencia de fagos se correlacionaba con la eliminación de la enfermedad en pacientes con disentería, y llevó a cabo un estudio con conejos, en el que los fagos proporcionaban protección contra la infección por *Shigella spp.* La mayoría de las investigaciones iniciales de fagos realizadas entre los años 1920 y 1930 se centraron en el desarrollo de la terapia con fagos para el tratamiento de infecciones bacterianas (Summers, 2001). Sin embargo, debido a la aparición de los antibióticos, esta idea de utilizar los fagos como antibacterianos fue olvidada durante décadas.

Al igual que los virus, los bacteriófagos son parásitos intracelulares estrictos que utilizan la maquinaria de la bacteria huésped para replicarse (van Regenmortel *et al.*, 2000), están presentes en todos los hábitats de La Tierra (**Tabla 1**) y se calcula que es la entidad biológica más abundante del planeta, con una estimación teórica de 10^{31} fagos (Whitman *et al.*, 1998).

Origen	Concentración	Referencia
Ambientes oceánicos	10^4 - 10^5 VLP/mL	(Paul JH and Kellogg CA, 2000)
Ambientes de costa litoral	10^6 - 10^7 VLP/mL	(Paul JH and Kellogg CA, 2000)
Lagos y estuarios	10^8 - 10^9 VLP	(Hennes KP and Suttle CA, 1995)
Sedimentos	$>10^8$ - 10^9 VLP	(Danovaro <i>et al.</i> , 2002)
Salinas	10^8 - 10^{10} VLP/mL	(Boujelben <i>et al.</i> , 2012)
Suelo	10^7 - 10^8 VLP/g	(Ashelford <i>et al.</i> , 2003)
Intestino	5×10^7 - 10^{10} VLP/g	(Lepage <i>et al.</i> , 2008)
Mucosa intestinal	$>10^8$ VLP/mm ²	(Letarov and Kulikov, 2009)

Esputos de pacientes con infecciones bronquiales.	10^3 - 10^7 UFP on <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Tejedor <i>et al.</i> , 1982)
Plantas	$>10^6$ UFP/g	(Ritchie DF; Klos EJ, 1977)
Lodos de aguas residuales	$>10^9$ VLP/mL	(Otawa <i>et al.</i> , 2007)
Agua residual "cruda"	10^8 VLP/mL	(Rosario <i>et al.</i> , 2009)
Agua potable	10^5 - 10^6 VLP/mL	(Rosario <i>et al.</i> , 2009)

Tabla 1. Localización y abundancia de bacteriófagos. UFP: Unidades formadoras de calva; VLP: Virus-like particles (Muniesa *et al.*, 2013b).

Los fagos pueden medir entre 20 y 200 nm. Presentan material genético que puede ser ADN o ARN (mono o bicatenario). El material genético se encuentra envuelto por una cápside proteica. Normalmente, la cápside está unida a una cola que tiene fibras, usadas para las uniones a receptores en la superficie de las células bacterianas. Algunos presentan una cápside icosaédrica sin cola y, en caso de tener cola, ésta puede ser contráctil o flexible, larga o corta, recta o curvada, pero en cualquier caso la utilizan para la introducción del ácido nucleico dentro de la célula bacteriana. Todos los fagos con cola pertenecen al orden de los Caudovirales, fagos de doble cadena de ADN, y según la morfología de la cola, pueden clasificarse en tres grandes familias: miofagos (*Myoviridae*) con colas largas y contráctiles, sifofagos (*Siphoviridae*) con colas largas no contráctiles y podofagos (*Podoviridae*) con colas cortas no contráctiles (Ackermann, 2003). Las tres familias pueden infectar *E. coli* y, aparte de los Caudavirales, *E. coli* también puede ser infectada por una familia de fagos filamentosos de ADN de cadena sencilla, que no poseen cápside poliédrica ni cola (*Inoviridae*), por fagos icosaédricos sin cola de ADN de cadena sencilla (*Microviridae*) o, en caso de cepas conjugativas F+, fagos icosaédricos sin cola de ARN de cadena sencilla positiva, pertenecientes a la familia *Leviviridae* (Muniesa *et al.*, 1999).

1.8.1. Ciclos de replicación en bacteriófagos

Los bacteriófagos pueden clasificarse en: fagos virulentos y fagos atemperados según propaguen mediante un ciclo lítico o lisogénico respectivamente. Los virulentos son aquellos que cuando infectan a su bacteria huésped sólo tienen la opción de iniciar la replicación, provocando finalmente la lisis celular, por lo tanto hablamos de fagos que siguen sólo el ciclo lítico. Los fagos atemperados, una vez infectan a la célula pueden entrar en ciclo lítico o lisogénico (**Figura 8**). Durante el ciclo lisogénico, cuando el fago está integrado dentro del cromosoma bacteriano, se le denomina profago (Weinbauer, 2004). Cuando el ácido nucleico viral se integra en el genoma bacteriano, el hospedador sobrevive, se divide normalmente y da lugar a bacterias lisogenizadas (lisógenos). En estos lisógenos no se sintetizan proteínas estructurales del fago, ya que casi todos los genes del fago están reprimidos. Este profago permanecerá en la bacteria lisogenizada y transfiriéndose por

transferencia genética vertical (*Vertical gene transfer; VGT*) hasta que se produzca algún tipo de estrés inductor, desencadenando el inicio de la producción viral. A través de la lisogenia, el huésped gana inmunidad a la sobreinfección por fagos estrechamente relacionados y dependiendo del fago, podría donar a la bacteria la adquisición de genes de resistencia a antibióticos, genes que codifican para toxinas, mayor tolerancia a salinidad, etc. Tales rasgos adquiridos pueden aumentar la adaptación de la célula a unas condiciones ambientales específicas, en cuyo caso se seleccionarán positivamente (Wommack and Colwell, 2000; Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004).

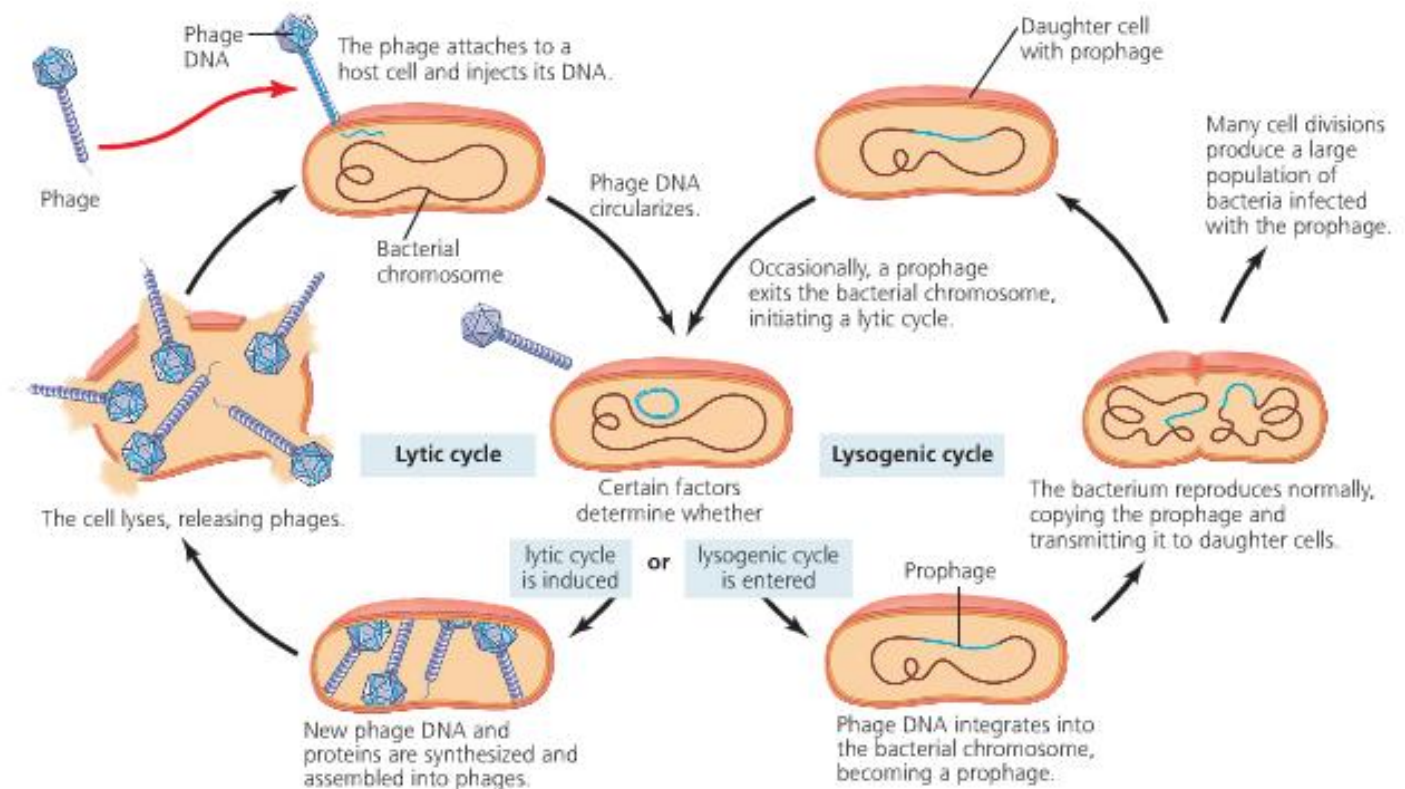


Figura 8. Ciclo lítico y lisogénico en fagos atemperados (Biotechkhan.wordpress, 2014).

El ciclo del fago atemperado λ , cuya bacteria hospedadora es *E. coli*, es uno de los más estudiados en la microbiología molecular (Engelberg-Kulka and Kumar, 2015) y sirve como modelo para otros fagos. El **ciclo lítico** descrito en el fago λ está caracterizado por las siguientes fases:

- **Adsorción a la bacteria.** La fase de adsorción se inicia cuando coinciden al azar una partícula fágica y una bacteria hospedadora. Si el virión (fago en fase de “vida libre”) reconoce un receptor específico en la superficie bacteriana, se puede producir la adsorción. En este proceso de fijación de la partícula fágica sobre la superficie de la célula hospedadora bacteriana pueden intervenir un cierto número de elementos, tales como:
 - Receptores de la pared bacteriana. Generalmente de tipo lipoproteico, polisacárido o ambas cosas a la vez. La síntesis de estos receptores viene determinada por el genoma bacteriano, y en consecuencia, un proceso de mutación puntual puede

convertir una bacteria sensible en una bacteria resistente a la infección. La especificidad fago-bacteria viene determinada por el receptor. Se pueden establecer para cada bacteriófago diferentes patrones de espectro de huésped. De este modo, se pueden encontrar bacteriófagos de amplio espectro de hospedadores que utilizan receptores presentes en varias cepas y especies bacterianas, y fagos de espectro reducido, muy específicos, que utilizan un receptor presente únicamente en una especie o cepa bacteriana.

- Características de la placa basal del bacteriófago, que es el elemento que entra en contacto con el receptor de la célula hospedadora, así como las fibras que mantienen esta fijación.
 - Presencia de cofactores de adsorción, como los iones calcio, el magnesio, o algunos aminoácidos que contribuyen al mantenimiento de la unión entre el bacteriófago y la célula hospedadora.
 - Concentración de bacterias y fagos en el medio, factor limitante importante dado que las uniones se establecen debido a encuentros al azar y el número garantiza estos encuentros.
- Fase de penetración. La fase de penetración en el caso de los gram negativos, se inicia cuando la cola del fago atraviesa la membrana externa o LPS. Entonces una lisozima fágica, localizada en la cola del bacteriófago, despolimeriza las uniones de acetilmurámico y acetilglucosamina del peptidoglicano de la pared bacteriana. Esto hace disminuir la rigidez de la pared bacteriana en ese punto y produce una microperforación a través del espacio periplasmático y la capa de peptidoglicano. A continuación en caso de *Caudovirales*, las fibras y la vaina de la cola del bacteriófago cambian la forma y la ordenación de sus protómeros proteicos para permitir que el canal central de la cola penetre la pared bacteriana. Cuando el extremo de este canal llega a la membrana citoplasmática bacteriana, el ácido nucleico deja la cápside fágica y atraviesa el canal, hasta que finalmente el ADN del fago penetra en el citoplasma bacteriano. Las cápsides proteicas de los fagos, que ahora se encuentran vacías, reciben el nombre de “fantasmas”, y quedan fijadas en la superficie de la bacteria o libres en el medio.
 - Fase de latencia. Esta fase se caracteriza por la interrupción de la síntesis de componentes y otros procesos metabólicos bacterianos, y por la inducción de enzimas dirigidos a la síntesis de los componentes fágicos. En el caso de los fagos de ADN, cuando el ácido nucleico del bacteriófago llega al citoplasma bacteriano, la ARN polimerasa del hospedador transcribe inmediatamente una parte del ADN fágico. Los ribosomas que hay en la bacteria traducen este ARN mensajero y sintetizan una colección de enzimas fágicas. Una parte de estas enzimas se encargan de interrumpir la síntesis de macromoléculas bacterianas, mientras que el resto de enzimas se ocupan de dirigir los procesos de replicación del ácido nucleico del fago. Los procesos de replicación del ácido nucleico varían según el tipo de molécula (ADN o ARN) presente en el bacteriófago. Durante toda la etapa de latencia se van acumulando en el citoplasma bacteriano diferentes moléculas de ácido nucleico fágico, así como algunas de las

proteínas que constituirán la cápside del virión, pero aún no se detecta la presencia de nuevas partículas fágicas con capacidad infectiva.

- **Fase de maduración.** Los diferentes componentes fágicos se acoplan y dan lugar al virión maduro. Este proceso es controlado por sistemas de control codificados por el ácido nucleico del bacteriófago. Al mismo tiempo que se acumulan los capsómeros (subunidades proteicas que formarán la cápside), y las moléculas de ácido nucleico fágico se condensan. La combinación de las subunidades de la cápside con estas condensaciones de ácido nucleico da lugar a la formación de cabezas maduras (encapsidación del ácido nucleico). La maduración se completa mediante un proceso de polimerización de otras subunidades que forman la cola, seguido del acoplamiento de cabezas y colas, que dará lugar a una nueva progenie de viriones totalmente maduros e infectivos.
- **Fase de liberación de los viriones.** En esta fase, los viriones maduros dejan la bacteria y una nueva progenie de bacteriófagos es liberada al medio. El proceso se inicia con la aparición, en el citoplasma bacteriano, de una proteína específica del virus: la endolisina fágica. Esta endolisina actúa sobre la capa de peptidoglicano de la pared bacteriana, hidrolizando los enlaces existentes entre los azúcares que forman sus cadenas principales. Como consecuencia de este ataque enzimático, la pared bacteriana se va debilitando, hasta que se produce la lisis por presión osmótica interna de la célula. En el momento en que se produce la lisis, los bacteriófagos son liberados al medio junto con los restos del contenido celular bacteriano.

1.8.2. Lisis o lisogenia, una importante decisión en fagos atemperados

Usando de nuevo como modelo el fago λ , una vez que este se encuentra con una bacteria huésped, y lleva a cabo las fases de adsorción y penetración, el ADN fágico ya en el citoplasma bacteriano, normalmente se circulariza por la unión de extremos cohesivos gracias a ligasas de la propia bacteria, de esta forma dificulta su degradación por las endonucleasas bacterianas (Herskowitz and Hagen, 1980). Se han descrito algunos fagos, como el P1, que en vez de circularizarse e integrarse en el cromosoma bacteriano, se mantienen en el citoplasma de la célula bacteriana actuando como un plásmido.

En el caso de λ , y fagos similares, llamados lamboides (como los fagos Stx), la regulación de la lisogenización está principalmente controlada por el gen *int* y el gen represor *ci*. Cuando λ infecta, la proteína Int y CI no se expresan inicialmente. El fago inicia la expresión génica a lo largo de un conjunto de eventos que son comunes a la vía lítica y lisogénica. Si las condiciones son favorables durante esta fase inicial, la síntesis de Int y CI puede activarse para permitir la integración del fago en el cromosoma bacteriano y el progreso y mantenimiento del ciclo lisogénico. En primer lugar Int permite la integración del genoma del fago en el cromosoma bacteriano. La proteína represora CI desactiva la expresión de otros genes del fago a la vez que favorece su propia transcripción. Esto evita la expresión y activación del ciclo de vida lítico y permite que las bacterias lisogenizadas se dividan y transmitan el ADN fágico como profago de manera vertical. La región reguladora de lisis-

lisogenia también presenta el gen *cro*. Este gen *cro* es el antagonista de *cl*, y su expresión junto con la de otros genes activan el ciclo lítico y por tanto la lisis de la bacteria. El equilibrio entre la expresión de *cl* y *cro* permite al fago λ decidir entre lisis o lisogenia (Arkin *et al.*, 1998; Joh and Weitz, 2011). A mayor concentración de *Cl* se mantiene la lisogenia, a mayor concentración de *Cro*, se inhibe la expresión de *Cl*, se promueve la expresión de *Cro* y esto lleva a la activación del ciclo lítico.

Sin embargo, este equilibrio entre *cro* y *cl* no explica exclusivamente el comportamiento del fago. Por ejemplo existen mutaciones que alteran la propensión a la lisogenización, y también se sabe que varios factores externos y ambientales afectan a esta relación (Gandon, 2016). Dentro de estos factores, la lisogenia es más frecuente con una alta multiplicidad de infección, un crecimiento lento y cuando las células bacterianas son de pequeño tamaño, es decir, las malas condiciones de crecimiento del huésped conducen a células pequeñas y a un ratio de crecimiento bajo, lo que reduce el beneficio de ingresar al ciclo lítico. Las altas concentraciones de fagos en el medio ambiente también reducen la tasa de replicación del fago ya que estarían disponibles pocos huéspedes para nuevas infecciones (St-Pierre and Endy, 2008; Zeng *et al.*, 2010).

En el caso de los fagos *Stx*, sujetos de estudio en esta tesis y que también son fagos de tipo lamboide, la decisión entre la lisis y la lisogenia tras la infección también depende de *cl* y *cro*. Al igual que en el fago λ , el gen *cl* codifica un represor de la lisis que promueve el ciclo lisogénico, mientras que *cro* codifica una proteína esencial antirrepresora para el desarrollo del ciclo lítico.

La relación entre los fagos atemperados y las bacterias es compleja, y comprende tanto costes como beneficios para ambos. Para la bacteria, los costes de llevar insertados profagos incluyen, obviamente, el riesgo de muerte celular si se induce la lisis (De Paepe *et al.*, 2016; Imamovic *et al.*, 2016), los costes fisiológicos extras de mantener material genético adicional y los posibles efectos citotóxicos de los genes del profago (Millan *et al.*, 2015). Respecto a los beneficios para la bacteria, se han sugerido una serie de adaptaciones ecológicas y evolutivas que podrían aportar los profagos a su bacteria huésped. Existen tres principales beneficios potenciales (**Figura 9**): los profagos son agentes esenciales de transferencia horizontal de genes (HGT), fuente de variación genética para la innovación evolutiva, y pueden ser importantes armas en la competencia con otras bacterias (Harrison and Brockhurst, 2017).

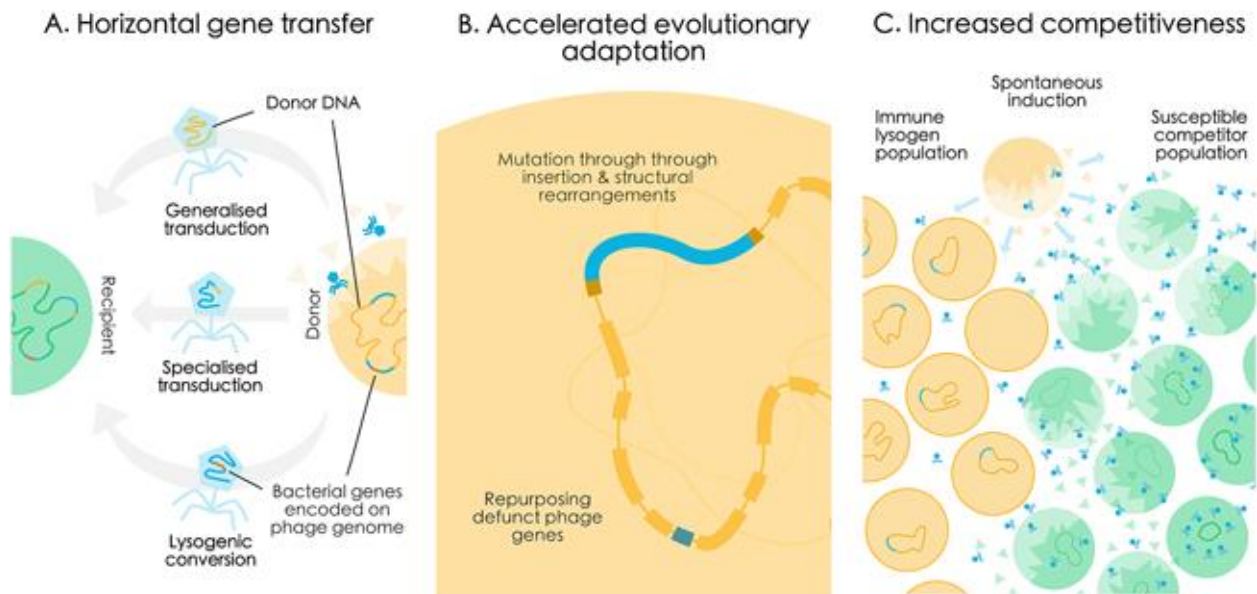


Figura 9. Los beneficios potenciales de la interacción bacteria-profago. A) Los fagos atemperados pueden mediar en la transferencia génica horizontal de bacterias a través de la transducción (ya sea generalizada, especializada o conversión lisogénica). B) Los profagos pueden acelerar la velocidad de adaptación bacteriana a través de de la inserción y la transposición, que generan nuevas mutaciones y reordenamientos. C) Los fagos atemperados pueden ser “armas de guerra” contra otras poblaciones bacterianas, ya que las bajas tasas de inducción crean partículas de fagos infecciosos que matan a competidores susceptibles en una ola de infección, mientras que los demás lisógenos son inmunes (Harrison and Brockhurst, 2017).

1.8.3. Inducción fágica: activación del ciclo lítico

Esta inducción puede producirse en ocasiones de manera espontánea (Nanda *et al.*, 2015) o bien cuando el lisógeno es sometido a algún tipo de estrés externo como por ejemplo radiación UV, antibióticos, inductores eucariotas, metales pesados, etc que puedan causar un daño en el ADN bacteriano. Bajo estas condiciones se produce una activación de la respuesta SOS en la célula bacteriana. La activación SOS en respuesta al daño del ADN, lleva a la detención de la división celular, a la activación de la reparación del ADN, a la inducción de los posibles profagos y al aumento de las tasas de mutación. El sistema SOS es una red reguladora de reparación de ADN programada, que da como resultado mayor tasa de mutaciones e intercambio genético (Matic *et al.*, 1995), presumiblemente para facilitar la variabilidad genética que permita adaptarse a la célula a la nueva situación de estrés (Radman *et al.*, 1999).

La respuesta de SOS está muy extendida entre las bacterias y existe una variación considerable en su composición y regulación entre diferentes especies. En algunos patógenos bien caracterizados, la inducción de la respuesta SOS modula la evolución y diseminación de la resistencia a los antibióticos, así como la síntesis, secreción y diseminación de factores de virulencia (Butala *et al.*, 2009).

La activación del sistema SOS está mediada por los genes *lexA* (locus para la sensibilidad de rayos X A) y la activación de *recA* (recombinasa A con acción proteasa) (Howard-Flanders and Theriot, 1966). La actividad proteasa de RecA degrada el represor Cl. Al degradarse Cl disminuye su concentración a la vez que deja de realizar su actividad represora sobre *cro* y de estimular su propia síntesis. Libre del represor, *cro* se expresa y auto induce su propia síntesis a la vez que inhibe *cl*, aumentando su concentración y como consecuencia causando la activación del ciclo lítico (Tinsley *et al.*, 2006).

1.8.4. Transducción

Como hemos visto anteriormente, la transducción es la transferencia horizontal de genes (HGT) mediada por bacteriófagos. La transducción impulsa la evolución de los procariontes, y puede darse principalmente por dos mecanismos sustancialmente diferentes (**Figura 10**): La transducción generalizada y la transducción especializada. Ambos tipos de transducción da lugar a la **conversión lisogénica** cuando los fagos infectan a una bacteria receptora y le transfieren nuevos genes. Los tipos de transducción dependen del estilo de vida de los fagos, de los mecanismos de empaquetamiento y de otros procesos moleculares (Touchon *et al.*, 2017).

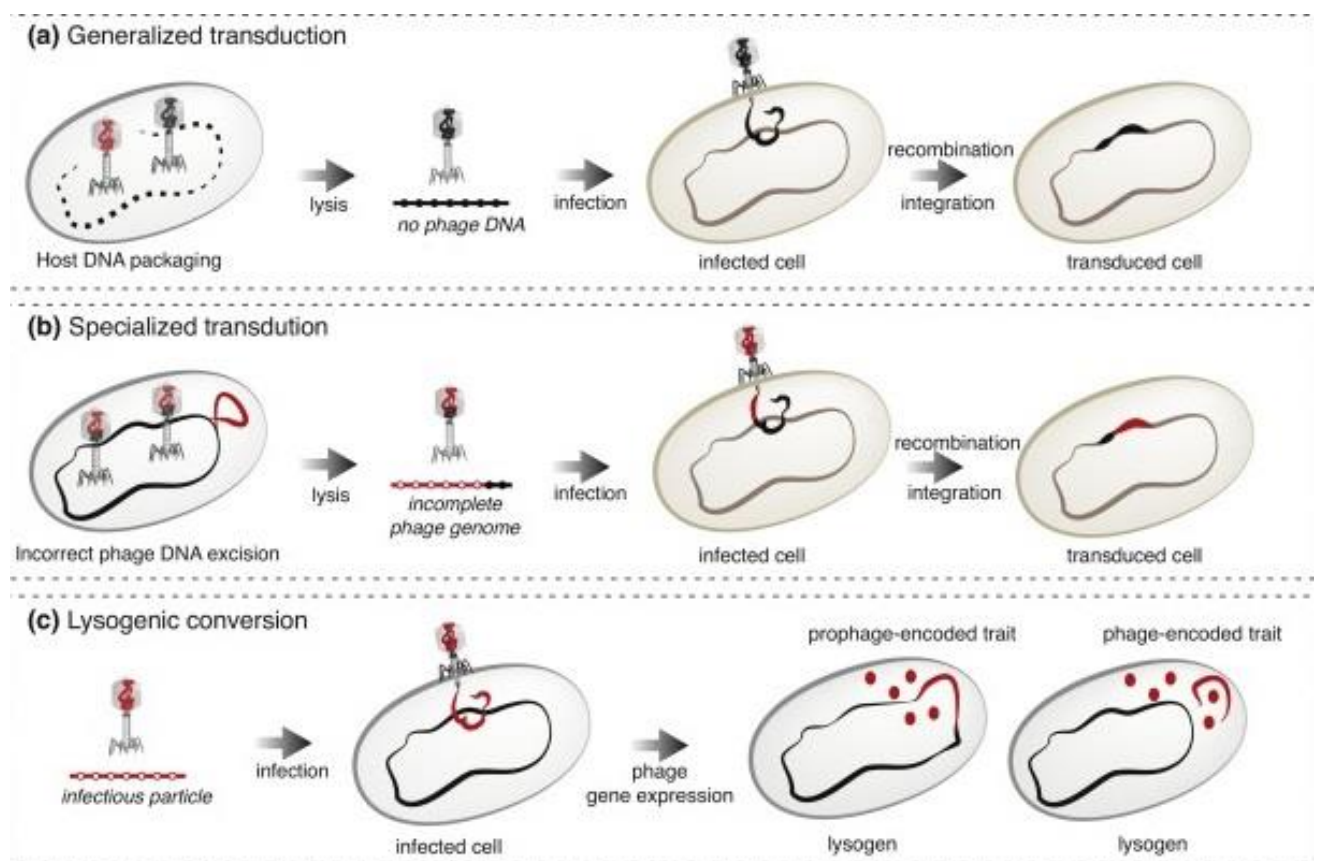


Figura 10. La transducción ocurre cuando los fagos recién formados adquieren genes del huésped y los transfieren a otras células bacterianas. (a) La transducción generalizada puede transferir fragmentos aleatorios de ADN cromosómico o plasmídico del hospedador a otras células sensibles a estos fagos. Puede ocurrir tanto por fagos atemperados como virulentos. (b) La transducción especializada se debe a la

escisión defectuosa del profago del cromosoma del huésped que conduce a un genoma del fago con genes del fago (rojo) y del hospedador (negro). (c) La conversión lisogénica ocurre cuando un profago induce un cambio en el fenotipo de la célula infectada (que no es parte del ciclo de vida del fago). Por ejemplo, los profagos pueden codificar proteínas tales como toxinas (círculos rojos) (Touchon *et al.*, 2017).

- ✓ **Transducción generalizada**: La transducción generalizada es el resultado de “errores” continuos en el empaquetamiento del ADN por parte del fago, pudiendo empaquetar aleatoriamente tanto ADN cromosómico y plasmídico bacteriano, como su propio ADN. Este mecanismo puede transferir incluso el ADN 16S bacteriano (Beumer and Robinson, 2005). Ocurre durante el ciclo lítico, cuando los enzimas responsables de cortar el ADN viral (en la secuencia *pac*) cortan por “error” fragmentos del ADN bacteriano que serán empaquetados en partículas fágicas. Estas partículas pueden infectar a una nueva bacteria huésped y el ADN podrá incorporarse o no por recombinación, pero no podrá volver a entrar en ciclo lítico, ya que no posee los genes fágicos necesarios para hacerlo. Hasta hace poco, se pensaba que la transducción generalizada se producía a baja frecuencia. Sin embargo, recientes análisis observaron tasas de transducción cercanas al 1% (Kenzaka *et al.*, 2010). La existencia de transducción generalizada plantea serias preocupaciones de cara a la aplicación de las terapias fágicas, ya que este proceso puede transferir factores de virulencia o resistencias entre las poblaciones bacterianas aunque se usen fagos virulentos (Matilla *et al.*, 2014).
- ✓ **Transducción especializada**: La transducción especializada resulta de un proceso de escisión inexacta del profago insertado en el cromosoma, que conduce al empaquetamiento del material genético del profago (total o parcialmente) y una pequeña parte de ADN cromosómico contiguo al profago. Similar a ésta, se hace referencia también a transducción especializada cuando se transporta un fragmento específico de ADN bacteriano dentro del genoma del fago, aunque no sea directamente un fragmento de la zona adyacente a la zona de inserción del fago. Este sería el caso de los fagos Stx, que llevan los genes de *stxA* y *stxB* en la zona de genes tardíos del genoma del fago. La transducción especializada se produce a muy baja frecuencia en λ y fagos similares, habiéndose descrito también en otros bacteriófagos (Fernandes *et al.*, 1989). Se lleva a cabo exclusivamente por fagos atemperados y la integración de la información genética en el nuevo genoma del huésped puede depender de la maquinaria de la capacidad de integración de dicho fago atemperado en el genoma bacteriano. La presencia de profagos atemperados en un genoma suele conferir *inmunidad* en mayor o menor grado, esto es, la resistencia a la *superinfección*, o segunda infección de la célula por el mismo tipo fago. Sin embargo, se ha observado que para los fagos Stx, no existe un elevado grado de inmunidad y se pueden hallar más de una copia del mismo o similar fago Stx en la misma célula.

Conversión lisogénica

La conversión se produce cuando un fago atemperado o una partícula de transducción generalizada se introduce dentro de la bacteria receptora y le transmite nuevo material genético. En muchos casos la expresión de los genes del profago o de la partícula de transducción generalizada conduce a

cambios fenotípicos en el huésped que pueden afectar a muchos rasgos diferentes, como la virulencia, la motilidad y la competencia entre bacterias (Bondy-Denomy and Davidson, 2014; Obeng *et al.*, 2016) o incluso la capacidad de realizar fotosíntesis (Mann *et al.*, 2003).

La contribución de los profagos a la diversidad de repertorios genéticos puede ser enorme, por ejemplo se ha calculado que representan el 41% del genoma accesorio de un estudio con 47 cepas de *E. coli* (Bobay *et al.*, 2013). De hecho, algunos genes codificados por profagos son responsables de la alta virulencia del patógeno en una serie de importantes enfermedades humanas como la escarlatina, la shigelosis, la difteria, el cólera o el botulismo (Eklund *et al.*, 1971; Gill *et al.*, 1972; McCloskey, 1973; O'Brien *et al.*, 1984), donde el profago codifica toxinas o proteínas que modulan la interacción huésped-patógeno. A menudo, la producción de toxinas, como la botulínica o la toxina Shiga, por ejemplo, requieren la lisis de la bacteria para liberar la toxina, de modo que los beneficios se acumulan en la población bacteriana relacionada con la infección, y no en las bacterias productoras (Fortier and Sekulovic, 2013).

En el caso de fagos atemperados, la inducción del profago en situaciones de viabilidad del hospedador conduce a la replicación del fago a costa de la muerte celular. Por lo tanto, los rasgos adaptativos adquiridos por la conversión lisogénica tienen un riesgo significativo para el huésped (Paul, 2008). Este riesgo no tiene lugar cuando la bacteria ha introducido el ADN inyectado por una partícula de transducción generalizada, porque ésta no es capaz de volver a propagar ya que el ADN no contiene genes fágicos, sino sólo genes bacterianos y por tanto no será capaz de generar una nueva progenie de fagos que lisen a la célula huésped.

En ocasiones ciertas mutaciones pueden inactivar al profago y reducir su capacidad de matar al huésped. La alta frecuencia de profagos defectuosos se observó antes (Canchaya *et al.*, 2003), y es coherente con estudios de bioinformática que muestran que una gran parte de los profagos en *E. coli* son defectuosos (Bobay *et al.*, 2014). En teoría, la existencia de recombinación entre fagos infecciosos y profagos, podría permitir la reactivación de profagos defectuosos corrigiendo sus mutaciones inactivantes (Menouni *et al.*, 2015) y la generación de nuevos fagos generados por recombinación de los ya existentes en el genoma bacteriano.

Gene Transfer Agents (GTAs)

En 1974, estudios centrados en la bacteria marina *Rhodobacter capsulatus* mostraron la existencia de elementos extracelulares capaces de realizar transferencia génica entre bacterias (Marrs, 1974). Estos elementos fueron llamados “Gene transfer agents” (GTAs). Los GTAs movilizan genes de resistencia a antibióticos en una frecuencia mucho más elevada que cualquier otro mecanismo de transferencia genética (Solioz *et al.*, 1975).

Los GTAs son partículas que se asemejan a una cápside fágica y en ocasiones también presentan cola. A pesar de su parecido con los bacteriófagos, muestran importantes diferencias. Por ejemplo, la célula bacteriana donadora posee genes que codifican proteínas estructurales de la cápside y proteínas implicadas en el empaquetamiento del ADN, pero carecen de otros genes de bacteriófago.

Los genes GTA solo están presentes en las bacterias donadoras y no se transfieren a las bacterias receptoras. Los propios genes GTA podrían transferirse en partículas GTA, pero no suelen hacerlo dado que están “ocupados” expresándose y no son replicados a niveles elevados. Cuando se compara con la transducción generalizada mediada por fagos, la principal diferencia es que la transferencia de GTA, que se da en una tasa mucho más elevada, no requiere infección previa por una partícula fágica (Lang *et al.*, 2012), porque la información para el empaquetamiento del ADN por el GTA ya está presente en la bacteria. Teóricamente, cualquier gen bacteriano puede transferirse mediante GTA, y la única limitación es el tamaño de la cápside de GTA, que limita el tamaño del ADN empaquetado (<5 kb) (Spano *et al.*, 2007). La activación de los genes GTA dependen de varios factores, tales como, la fase de crecimiento bacteriana, la concentración de fosfatos, y la activación en respuesta a la proteína reguladora CtrA (Brimacombe *et al.*, 2014).

1.9. Bacteriófagos atemperados: Fagos portadores de la toxina Shiga, fagos Stx

La toxina Shiga (Stx) es codificada por los genes *stx*. Estos genes son transportados por bacteriófagos atemperados (O'Brien *et al.*, 1984), que, después de infectar a una *E. coli* susceptible, inyecta su material genético y lo integra dentro del genoma bacteriano, manteniéndose en estado lisogénico. La bacteria lisogenizada adquiere el gen *stx* y con ello la capacidad de expresar la toxina; convirtiéndose así en una STEC.

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* (Muniesa and Schmidt, 2014). Se agrupan en fagos Stx1 y fagos Stx2, dependiendo de la toxina que codifiquen.

El tamaño de los fagos Stx varía entre 42.6 kb y 66.4 kb (Brüssow *et al.*, 2004; Muniesa *et al.*, 2004) Se observan, principalmente, tres tipos de morfologías: *Podoviridae*, *Siphoviridae*, y en menor medida *Myoviridae* (Yan *et al.*, 2011) (**Figura 11**).

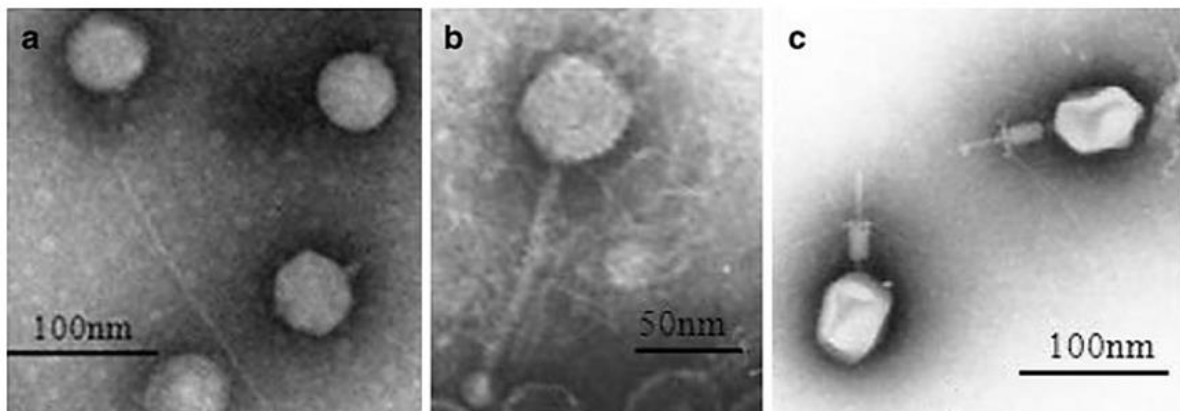


Figura 11. Principales morfologías de los fagos Stx. A) *Podoviridae*, B) *Siphoviridae*, C) *Myoviridae* (Yan *et al.*, 2011).

Los fagos Stx atemperados pueden revertir desde el estado lisogénico por inducción del ciclo lítico, principalmente debido a condiciones ambientales o agentes antimicrobianos. El ciclo lítico comienza por propagar el genoma del fago, generando múltiples copias de *stx*, lo que causa un aumento en la Stx producida por la célula durante el proceso (Neely and Friedman, 1998; Wagner *et al.*, 2001; Tyler *et al.*, 2004; Johannes and Römer, 2010). Mediante la expresión del genoma del fago, se generan nuevas cápsidas fágicas, conteniendo el ADN del fago y, una vez formadas, las partículas del fago se liberan de la célula mediante lisis. Una vez liberadas, los fagos Stx permanecen libres fuera de la

célula bacteriana, y en muchos casos, serán excretados directamente en las heces del animal (Martinez-Castillo *et al.*, 2013), liberándose al medio ambiente. La liberación de los fagos por la lisis celular, produce también la liberación de la toxina Stx producida.

Los fagos son partículas bastante simples y los fagos Stx no son una excepción. Su persistencia fuera de la célula es elevada por su capacidad de persistencia ante los procesos de inactivación natural, muchos de los cuales inactivan a su huésped bacteriano.

En la actualidad, muchos de los métodos utilizados para detectar STEC en muestras tanto de origen clínico como de origen alimentario, se basan en métodos moleculares como PCR, qPCR o incluso NGS para detectar en la muestra la presencia del gen *stx* u otros genes de virulencia (Paton and Paton, 2003; Perelle *et al.*, 2004; Kagkli *et al.*, 2011). Los fagos Stx, que pueden encontrarse como fagos de vida libre en muchos ambientes y presentar una elevada persistencia (Imamovic and Muniesa, 2011; Rode *et al.*, 2011; Martinez-Castillo *et al.*, 2013; Allue-Guardia *et al.*, 2014), pueden también generar amplímeros *stx+* y generar lecturas NGS que puedan ser interpretadas como positivas para STEC. Es decir, los fagos Stx pueden generar falsos positivos en protocolos moleculares para la detección de STEC. Este hecho puede generar grandes pérdidas económicas en la industria alimentaria y diagnósticos clínicos erróneos. Esta problemática es objeto de estudio en uno de los capítulos de esta tesis.

1.9.1. Fagos Stx en el medio ambiente

Se han encontrado fagos Stx2 en multitud de ambientes diferentes. En todos ellos la presencia de Stx estuvo ligada a la contaminación fecal. Estos bacteriófagos, no solo circulan libremente por el agua residual humana, también se han encontrado fagos Stx infectivos en aguas residuales de distintas especies animales (Imamovic, Balleste, *et al.*, 2010), heces humanas (Martinez-Castillo *et al.*, 2013) y en ambientes en principio con menor contaminación fecal, como en agua de río (Dumke *et al.*, 2006). Se han detectado fagos Stx2 incluso en carnes (Imamovic and Muniesa, 2011), y ensaladas (Imamovic and Muniesa, 2011) aptas para el consumo, lo que muestra la ausencia de legislación sobre la presencia de fagos en muestras de alimentos.

MUÉSTRA	PAÍS	FAGOS STX2 DETECTADOS		REFERENCIA
		Stx2	Abundancia Stx2	
Agua residual (AR) humana	España	Positiva *	10 UFP.ml ⁻¹	(Muniesa and Jofre, 1998)
AR humana	Francia, Irlanda, Sudáfrica, Nueva Zelanda	Positiva	≥ 10 UFP.ml ⁻¹	(Muniesa and Jofre, 2000)
AR humana	Japón	Positiva *	-	(Tanji <i>et al.</i> , 2003)
AR humana	España	Positiva *	4,24 log ₁₀ UFP.ml ⁻¹	(M. Muniesa <i>et al.</i> , 2004)

AR ganado vacuno	España	Positiva *	4,45 lod ₁₀ UFP.ml ⁻¹	(M. Muniesa <i>et al.</i> , 2004)
Agua de rio	Alemania	Positiva *	-	(Dumke <i>et al.</i> , 2006)
AR humana	Reino Unido	Positiva *	9,41 log ₁₀ UFP.ml ⁻¹	(Rooks <i>et al.</i> , 2010)
AR humana	Reino Unido	Positiva	2,39 log ₁₀ CG.ml ⁻¹	(Rooks <i>et al.</i> , 2010)
AR humana	España	Positiva	1,37 log ₁₀ CG.ml ⁻¹	(Imamovic, Balleste, <i>et al.</i> , 2010)
AR ganado vacuno	España	Positiva	2,77 log ₁₀ CG.ml ⁻¹	(Imamovic, Balleste, <i>et al.</i> , 2010)
AR ganado porcino	España	Positiva	4,59 log ₁₀ CG.ml ⁻¹	(Imamovic, Balleste, <i>et al.</i> , 2010)
AR aves de corral	España	Positiva	1,11 log ₁₀ CG.ml ⁻¹	(Imamovic, Balleste, <i>et al.</i> , 2010)
Heces de ganado vacuno	España	Positiva	2,32 log ₁₀ CG.ml ⁻¹	(Imamovic, Balleste, <i>et al.</i> , 2010)
Carne	España	Positiva *	4,10 log ₁₀ CG.g ⁻¹	(Imamovic and Muniesa, 2011)
Ensalada	España	Positiva *	3,36 log ₁₀ CG.g ⁻¹	(Imamovic and Muniesa, 2011)
Heces de ganado porcino	China	Positiva *	-	(Yan <i>et al.</i> , 2011)
AR humana	Reino Unido	Positiva *	-	(Rooks <i>et al.</i> , 2012)
Heces humanas	España	Positiva *	4,41 log ₁₀ CG.g ⁻¹	(Martinez-Castillo <i>et al.</i> , 2013)

Tabla 2. CG: copias génicas; UFP, unidades formadoras de placa; *, capacidad infectiva de los fagos. Abundancia de bacteriófagos Stx2 en distintos ambientes extraintestinales (Martínez-Castillo and Muniesa, 2014).

El hecho de que los fagos Stx sean más persistentes en el medio ambiente que las bacterias (Allue-Guardia *et al.*, 2014), sumado a que algunos de estos fagos detectados en los alimentos (carnes y ensaladas) sean infecciosos es interesante, considerando la probabilidad de transducción de Stx en alimentos (Imamovic *et al.*, 2009). Este hecho es de especial relevancia teniendo en cuenta que las condiciones de tratado y procesamiento de estos alimentos no solo pueden ser ineficaz inactivando los fagos Stx, sino que puede provocar la inducción del fago Stx en sus huéspedes STEC, si están presentes. Esta inducción de fagos Stx se puede observar en el tratamiento térmico, las altas presiones hidrostáticas, la radiación UV u otras irradiaciones (Yamamoto *et al.*, 2003; Aertsen *et al.*, 2005; Yue *et al.*, 2012), y con la adición de ciertos compuestos durante la producción, como agentes quelantes (Imamovic and Muniesa, 2011), sal (Harris *et al.*, 2012) o antimicrobianos (Kimmitt *et al.*, 2000).

Los últimos años han sido testigos de una tendencia global hacia el consumo de una dieta saludable rica en frutas, verduras y productos vegetales frescos y crudos. Sin embargo, estas verduras pueden haber crecido en suelos contaminados, o donde se han añadido fertilizantes orgánicos, lo que implicaría un riesgo de contaminación por la toxina Stx, patógenos STEC o por los propios bacteriófagos Stx. Además, el suelo, el estiércol y el agua de riego son fuentes importantes de contaminación vegetal (Semenov *et al.*, 2008; Tyler and Triplett, 2008). El estudio de fagos Stx en estos ambientes vegetales es objeto de estudio en este trabajo.

1.10. Bacteriófagos, transducción generalizada y genes de resistencia a antibióticos

El papel de los bacteriófagos y la transducción en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) es un tema de investigación relativamente reciente. Estos genes se identifican con más frecuencia en elementos conjugativos que en fagos, al menos en ambientes clínicos (Ramírez *et al.*, 2014). Sin embargo, algunos trabajos han identificado ARGs en heces humanas lodos de depuradora (Calero-Cáceres *et al.*, 2014) y en aguas residuales humanas y animales (Colomer-Lluch, Imamovic, *et al.*, 2011). En estos estudios se usó la PCR cuantitativa a tiempo real para cuantificar los ARGs y se demostró que las β -lactamasas *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *mecA* estaban presentes en bacteriófagos de muestras de aguas residuales urbanas, fluviales y aguas y heces animales. Además, se demostró que los genes que conferían resistencia a la ampicilina detectados por qPCR eran funcionales y capaces de transferir la resistencia a cepas de *E. coli* susceptibles a la ampicilina (Colomer-Lluch, Jofre, *et al.*, 2011)(Colomer-Lluch *et al.*, 2011). Estas observaciones sugieren que los fagos podrían desempeñar un papel importante en la transmisión de ARGs en entornos extra-intestinales.

A partir de bacterias comensales portadoras de resistencias, los ARGs se pueden transferir por medio de bacteriófagos a patógenos por transducción generalizada, como la que pueden realizar en general los fagos virulentos así como también algunos fagos atemperados como por ejemplo el P22 de *Salmonella* (Muniesa *et al.*, 2013a). Los fagos derivados de transducción generalizada, a pesar de haber perdido su capacidad de replicarse y lisar a las bacterias son capaces de inyectar ADN y transferir el ARGs que podrá actuar en su nuevo huésped bien insertado en el cromosoma o en un plásmido, una isla genómica o movilizado mediante un transposon (Brown-Jaque *et al.*, 2015b).

La movilización o transferencia de ARGs por medio de bacteriófagos se ha documentado en diversas especies bacterianas: la transducción de eritromicina (Hyder and Streitfeld, 1978), tetraciclina o resistencias múltiples entre cepas de *Streptococcus pyogenes* (Ubukata *et al.*, 1975); la transferencia de resistencia a tetraciclina y gentamicina entre *Enterococcus* (Mazaheri Nezhad Fard *et al.*, 2011); el transporte de genes de β -lactamasa por bacteriófagos en *E. coli* (Billard-Pomares *et al.*, 2014) y *Salmonella* (Schmieger and Schicklmaier, 1999); o la transferencia de plásmidos de resistencia a antibióticos en MRSA (Varga *et al.*, 2012).

El efecto real de los tratamientos antibióticos en la transducción es complejo ya que las dosis subletales de antibióticos pueden estimular la inducción del ciclo lítico entre los lisógenos (Allen *et al.*, 2011) y aumentar las tasas de infección y transducción por fagos.

La transferencia de ARG en fagos como modelo de transducción generalizada ha sido objeto de estudio en el primer capítulo de esta tesis.



2. OBJETIVOS

Esta tesis analiza los mecanismos de transferencia de genes mediada por bacteriófagos. Nos centramos en partículas fágicas movilizadoras de genes de resistencia a antibióticos como modelo de transducción generalizada y en fagos Stx como modelo de transducción especializada. Los objetivos específicos corresponden a los capítulos de esta tesis y se presentan a continuación:

- Analizar, cuantificar y comparar la abundancia de 6 genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en el ADN viral y total en muestras de heces de individuos sanos, demostrando así la presencia de ARGs movilizadas por bacteriófagos de vida libre en las heces.

- Desarrollar un nuevo método para detectar y cuantificar partículas fágicas Stx1 y evaluar su abundancia en muestras ambientales, fecales y de alimentos. Comparar también estos resultados con datos existentes de Stx2.

- Evaluar la presencia, infectividad y la persistencia de fagos Stx en diferentes tipos de muestras vegetales y en tierra de cultivo. Así como la capacidad de estos fagos para transducir el gen *stx* y generar lisógenos *stx* + en los vegetales y la tierra de cultivo.

- Confirmar nuestra hipótesis de la interferencia de los bacteriófagos Stx en los métodos moleculares utilizados actualmente para detectar la presencia de STEC, y desarrollar un método para eliminar o reducir sensiblemente la presencia de fagos Stx libres en diferentes tipos de muestras para evitar el problema de detección de falsos positivos.

3. PUBLICACIONES



3.1. Listado de publicaciones:

La presente tesis doctoral se centra en cuatro artículos publicados (por orden de aparición en este trabajo):

- 1 **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”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 58(1): 606–609.

- 2 **Grau-Leal F, Quirós P, Martínez-Castillo A, Muniesa M. 2015.** “Free Shiga toxin 1-encoding bacteriophages are less prevalent than Shiga toxin 2 phages in extraintestinal environments”. *Environmental Microbiology*; 17(11):4790-801.

- 3 **Quirós P and Muniesa M. 2017.** “Contribution of cropland to the spread of Shiga toxin phages and the emergence of new Shiga toxin-producing strains”. *Scientific Reports*; 7(1):7796.

- 4 **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". *Applied and Environmental Microbiology*; 81(1):415-21.

3.2. Informe sobre la participación del doctorando en las publicaciones presentadas

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". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 58(1): 606–609.

El doctorando ha realizado una parte importante del trabajo experimental; homogenado de las muestras fecales, extracciones de ADN total y fágico, y PCRs cuantitativas. Colaborando también en el análisis e interpretación de los resultados obtenidos y creación de las figuras.

Grau-Leal F, Quirós P, Martínez-Castillo A, Muniesa M. 2015. "Free Shiga toxin 1-encoding bacteriophages are less prevalent than Shiga toxin 2 phages in extraintestinal environments". *Environmental Microbiology*; 17(11):4790-801.

El doctorando ha diseñado la qPCR para el gen *stx1*, y ha llevado a cabo parte del trabajo experimental como extracciones de ADN fágico, ensayos de infectividad y preparación de muestras para el microscopio electrónico. También ha colaborado en el análisis de resultados.

Quirós P and Muniesa M. 2017. "Contribution of cropland to the spread of Shiga toxin phages and the emergence of new Shiga toxin-producing strains". *Scientific Reports*; 7(1):7796.

El doctorando ha llevado a cabo todo el trabajo experimental (inducciones, homogenados, extracciones de ADN total y fágico, qPCR, ensayos de infectividad y persistencia bacteriana, hibridación de calvas de lisis, y formación de transductantes, etc) y ha colaborado en la interpretación de resultados y ha escrito la publicación..

Quirós P, Martínez-Castillo A, Muniesa M. "Improving detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by molecular methods by reducing the interference of free Shiga toxin-encoding bacteriophages". *Applied and Environmental microbiology*; 81(1):415-21.

El doctorando ha realizado la mayor parte del trabajo experimental, como los homogenados, lavados y filtrados de los distintos tipos de matrices, inducciones fágicas y qPCRs. Así como el análisis e interpretación de los resultados y creación de figuras.

Ninguno de los coautores de los artículos aquí expuestos ha utilizado los datos descritos en dichas publicaciones para elaborar su tesis doctoral.

3.3. Informe sobre los factores de impacto

Todas las publicaciones presentes en esta tesis doctoral, cuyo autor es Pablo Quirós Fernández, han sido publicadas en revistas científicas relevantes en la línea de investigación en las que ha trabajado y todas pertenecen al primer cuartil (Q1).

El artículo **“Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples”** fue publicado en la revista **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, perteneciendo al primer cuartil de las categorías “Enfermedades infecciosas” y “Farmacología” en el año 2014 y presentando ese mismo año un factor de impacto de **4,476**.

El artículo **“Free Shiga toxin 1-encoding bacteriophages are less prevalent than Shiga toxin 2 phages in extraintestinal environments”** fue publicado en la revista **Environmental Microbiology**, perteneciendo al primer cuartil de la categoría “Microbiología” en el año 2015 y presentando ese año un factor de impacto de **6,201**.

El artículo **“Contribution of cropland to the spread of Shiga toxin phages and the emergence of new Shiga toxin-producing strains”** fue publicado en la revista **Scientific Reports**, perteneciente al primer cuartil de la categoría “Multidisciplinar” en el año 2017 y presentando ese mismo año un factor de impacto de **4,259**.

Por último, el artículo **“Improving detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by molecular methods by reducing the interference of free Shiga toxin-encoding bacteriophages”** fue publicado en la revista **Applied and Environmental Microbiology**, perteneciente al primer cuartil de las categorías “Biotecnología” y “Ciencia de los alimentos” en el año 2015 y presentando un factor de impacto de **3,668**.

Dra. M. Muniesa

Barcelona, Abril de 2018

4. RESULTADOS



4.1. CAPÍTULO 1

Genes de resistencia a antibióticos en el ADN de bacteriófagos en muestras fecales humanas.

GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN EL ADN DE BACTERIÓFAGOS EN MUESTRAS FECALES HUMANAS.

Pablo Quirós, Marta Colomer-Lluch, Alexandre Martínez-Castillo, Elisenda Miró, Marc Argente, Juan Jofre, Ferran Navarro y Maite Muniesa.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014; 58(1):606-9.

Introducción

La resistencia a antibióticos puede obtenerse por mutación espontánea o por la incorporación de genes de resistencia a antibióticos (en inglés *antibiotic resistance gene*: ARG) (Lupo *et al.*, 2012). Los ARG se propagan entre las bacterias utilizando plataformas genéticas conocidas como elementos genéticos móviles (en inglés *mobile genetic elements*: MGE). Los MGE más comúnmente estudiados son plásmidos, transposones, integrones y, más recientemente se han descrito a los bacteriófagos (Zhang *et al.*, 2009).

Los bacteriófagos o fagos pueden llevar ARGs en bacterias Gram-positivas (Ubukata *et al.*, 1975; Schuch and Fischetti, 2006; Mazaheri *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2012) y Gram-negativas (Blahová *et al.*, 1992; Willi *et al.*, 1997; Schmieger and Schicklmaier, 1999; Oliver *et al.*, 2005). Recientemente, algunos estudios han sugerido que el papel de los fagos que llevan ARGs en el medio ambiente es mucho más importante de lo que se pensaba (Zhang *et al.*, 2009; American Academy of Microbiology, 2009; Cangelosi *et al.*, 2004; Brabban *et al.*, 2005). Se han descrito abundantes ARGs en la fracción de bacteriófagos en agua contaminada fecalmente (Muniesa *et al.*, 2004; Colomer-Lluch *et al.*, 2011). En ambientes clínicos existen numerosos estudios sobre plásmidos, integrones y transposones, sin embargo, existe poca información sobre el papel de los fagos como MGE de ARGs.

Objetivos

El objetivo de este estudio es evaluar el papel de los bacteriófagos como MGE de genes de resistencia. En trabajo analiza, cuantifica (qPCR) y compara 6 ARGs en el ADN de la fracción fágica y el ADN total aislado de muestras de heces humanas de individuos sanos.

Metodología y Resultados

El estudio se realizó utilizando 80 muestras fecales humanas de 46 mujeres y 34 hombres de 6 meses a 102 años de edad. Las muestras se recogieron en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, España) durante un período de 6 meses. Las muestras de heces se procesaron según protocolos convencionales para el aislamiento de bacterias enteropatógenas, rotavirus y adenovirus. Ninguno de los pacientes seleccionados estuvo involucrado en un brote de origen alimentario o mostró patología gastrointestinal grave. Hasta donde sabemos, ninguno de los pacientes recibió tratamiento antibiótico durante el tiempo del estudio.

Las muestras fecales se homogeneizaron realizando una dilución 1:5 (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) por agitación magnética durante 15 min. Cincuenta mililitros del homogeneizado se centrifugaron a 3.000 Xg, y el lisado del fago se purificó y se concentró como se describe previamente (Colomer-Lluch *et al.*, 2011; Colomer-Lluch *et al.*, 2011b). Las suspensiones de fago se trataron con ADNasa (100U/ml) para eliminar el ADN libre fuera de las partículas de fago. El ADN fágico se extrajo de la suspensión como se ha descrito previamente (Colomer-Lluch *et al.*, 2011b; Minot *et al.*, 2011; Sambrook and Russell, 2001). El ADN total se extrajo (incluyendo ADN bacteriano y viral Gram-positivo y Gram-negativo) de 200 µl del homogenado mediante el uso de un kit para extracción de ADN de heces QIAamp DNA (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los ARGs estudiados incluyeron dos grupos de beta-lactamasas (*bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M-1}), el gen *mecA*, responsable de la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus spp.*; *armA*, un gen que confiere resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos en bacterias Gram-negativas; y *qnrA* y *qnrS*, genes que proporcionan cierto grado de susceptibilidad reducida a las quinolonas.

Los procedimientos de PCR estándar y cuantitativa (qPCR) para *bla*_{TEM}, grupo *bla*_{CTX-M-1} y *mecA* se realizaron como se describió en estudios anteriores (Colomer-Lluch *et al.*, 2011b). El nuevo ensayo de qPCR para la cuantificación de *armA* fue diseñado usando la secuencia de *armA* en el plásmido pMUR050 (NC_007682.3) en una *Escherichia coli* de un aislado de cerdo (González-Zorn *et al.*, 2005). PMUR050 también se utilizó para generar curvas estándar (Colomer-Lluch *et al.*, 2011b). El ensayo de qPCR de *armA* tiene un rendimiento medio de 98,4% y un límite de detección de 2,74 copias de genes (CG). La qPCR de *qnrA* detecta siete variantes (*qnrA* 1 a 7), y la qPCR de *qnrS* detecta seis variantes (*qnrS* 1 a 6) (Lavilla *et al.*, 2008). El fragmento de 565 pb de *qnrA* se obtuvo a partir de la cepa 266 de *E. coli*, y el fragmento de 425 pb de *qnrS* se obtuvo de la cepa ambiental *Enterobacter cloacae* 565, aislada de aguas residuales. Ambos fragmentos fueron clonados en el vector pGEM-T-Easy (Promega, Barcelona, España) para generar las curvas estándar (Colomer-Lluch *et al.*, 2011b). La qPCR de *qnrA* mostró una eficiencia del 98,2% y un límite de detección de 3,1 CG/µl, y la qPCR de *qnrS* mostró un 99,4% de eficacia y un límite de detección de 8,3 GC /µl. Todos los ensayos de qPCR (véase la Tabla S1 en el material suplementario) se realizaron bajo condiciones estándar (Colomer-Lluch *et al.*, 2011; Colomer-Lluch *et al.*, 2011b). La secuenciación se realizó como se ha descrito anteriormente (Colomer-Lluch *et al.*, 2011b).

Cuando se analizaron los ARGs en el ADN total, todas las muestras fueron positivas para uno o más ARG (Figura 1A). Cuando se utilizó ADN de la fracción fágica, el 22,5% de las muestras fueron negativas para todos los ARGs y el 77,5% tenían una o más ARGs. Todos los ARGs analizados estuvieron presentes en algunas de las muestras, y se encontró que la distribución de los ARGs en el ADN del fago siguió el mismo orden de prevalencia que en el ADN total (Figura 1A).

Cuando los diferentes ARGs encontrados se cuantificaron por gramo de muestra fecal (Figura 1B), los valores más altos se observaron en el ADN total con diferencias en entre el ADN total y ADN de fago que iban desde 1,2 unidades logarítmicas para *armA* a 2,8 unidades logarítmicas para *mecA*. En el ADN fágico, *bla*_{TEM} mostró la mayor prevalencia y abundancia, con valores que llegaron a 6,8 log₁₀ copias genómicas (CG) / g. El segundo gen más prevalente fue *qnrA*. El grupo *bla*_{CTX-M1} fue el tercer gen más prevalente. *armA* mostró una baja prevalencia de sólo cinco muestras positivas pero con

elevadas cantidades (hasta 6 log₁₀ CG/g). El número de muestras positivas para *qnrS* y *mecA* en el ADN fágico fue bajo, lo que no nos permitió sacar conclusiones con respecto a su abundancia.

Los ensayos de qPCR producen un amplicón corto (entre 50 y 100 pb), y para confirmar mejor la identidad de los ARG detectados en el ADN del fago por secuenciación, amplificamos fragmentos más largos mediante PCR convencional. La secuenciación se realizó con cebadores directos e inversos y por duplicado y permitió verificar la presencia de los ARG detectados.

Discusión

La prevalencia de los ARG en el ADN total las muestras fecales corrobora las descripciones de la literatura. La novedad de este estudio es que por primera vez se detecta en la fracción de DNA fágico de estas muestras. *bla*_{TEM} es probablemente el ARG más frecuente en todo el mundo (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2010) y coincide con la abundancia del gen observada en el ADN fágico de las aguas residuales (Colomer-Lluch *et al.*, 2011; Colomer-Lluch *et al.*, 2011). El grupo *bla*_{CTX-M-1} fue tercero más numeroso en la fracción fágica y el segundo en el ADN total. Este grupo incluye *bla*_{CTX-M 15}, y se ha convertido en uno de los genes más extendidos en la última década (Cantón and Coque, 2006). Los genes *qnrA* y *qnrS* por su parte están ampliamente distribuidos en nuestra región (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Robicsek *et al.*, 2006) y son clínicamente relevantes (Lavilla *et al.*, 2008), particularmente *qnrA*, que fue el primer gen de resistencia a quinolonas descrito y el más común (Robicsek *et al.*, 2006b; Nordmann and Poirel, 2005). *armA* se incluyó en el estudio por su prevalencia en *Enterobacteriaceae*, y su rápida difusión por todo el mundo (González-Zorn *et al.*, 2005; Galimand *et al.*, 2005; Granier *et al.*, 2011). A pesar de ser poco prevalente, las muestras positivas mostraron densidades altas. Por el contrario, *mecA* no fue frecuente en este estudio. Esto es razonable dado que *Staphylococcus spp.* no es un habitante común del tracto intestinal. La detección previa de *mecA* en fagos de aguas residuales (Colomer-Lluch *et al.*, 2011b) puede ser atribuible a un origen no fecal, como los residuos de las duchas y lavamanos, dada la colonización de la piel por parte de *Staphylococcus*.

La alta prevalencia de ARGs en el ADN de fago aislado indica que los fagos podrían desempeñar un importante papel en la movilización de ARGs (Muniesa *et al.*, 2004; Colomer-Lluch *et al.*, 2011; Colomer-Lluch *et al.*, 2011b). La pregunta es si el origen de estos fagos podría ser partículas de fagos libres excretadas en heces, fagos libres en esos ambientes, o fagos inducidos a partir de las bacterias de la flora intestinal. Los resultados del presente estudio indican claramente que los fagos libres que codifican ARGs se excretan directamente de individuos sanos a través de heces. Los genes alojados por los fagos son funcionales y capaces de conferir resistencia a un antibiótico dado (Colomer-Lluch *et al.*, 2011b). Esto haría probable que una partícula fágica conteniendo un ARGs pueda infectar un nuevo huésped y transfiera así el ARG que podría ser incorporado en el genoma de la bacteria huésped por recombinación.

Un informe reciente indica que el contenido de ARGs en la fracción de ADN fágico del microbioma del intestino aumenta después del tratamiento antibiótico (Modi *et al.*, 2013). Algunos autores sugieren que la transducción generalizada de fagos podría ser la encargada de la movilización de

genes y plásmidos cromosómicos (Schuch and Fischetti, 2006; Willi *et al.*, 1997; Schicklmaier *et al.*, 1998). Nuestro estudio no permite todavía distinguir la naturaleza de las partículas.

Los fagos con ARG probablemente están presentes en alimentos y agua, pero normalmente no son detectados por los controles de calidad realizados. Sería entonces posible su ingestión, lo que podría causar la conversión de los huéspedes bacterianos susceptibles dentro del intestino, causando la emergencia de nuevas bacterias resistentes.

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

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

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

A group of antibiotic resistance genes (ARGs) (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *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*_{TEM}, *qnrA*, and *bla*_{CTX-M-1} 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*_{TEM} and *bla*_{CTX-M-1 group}); *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*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, 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

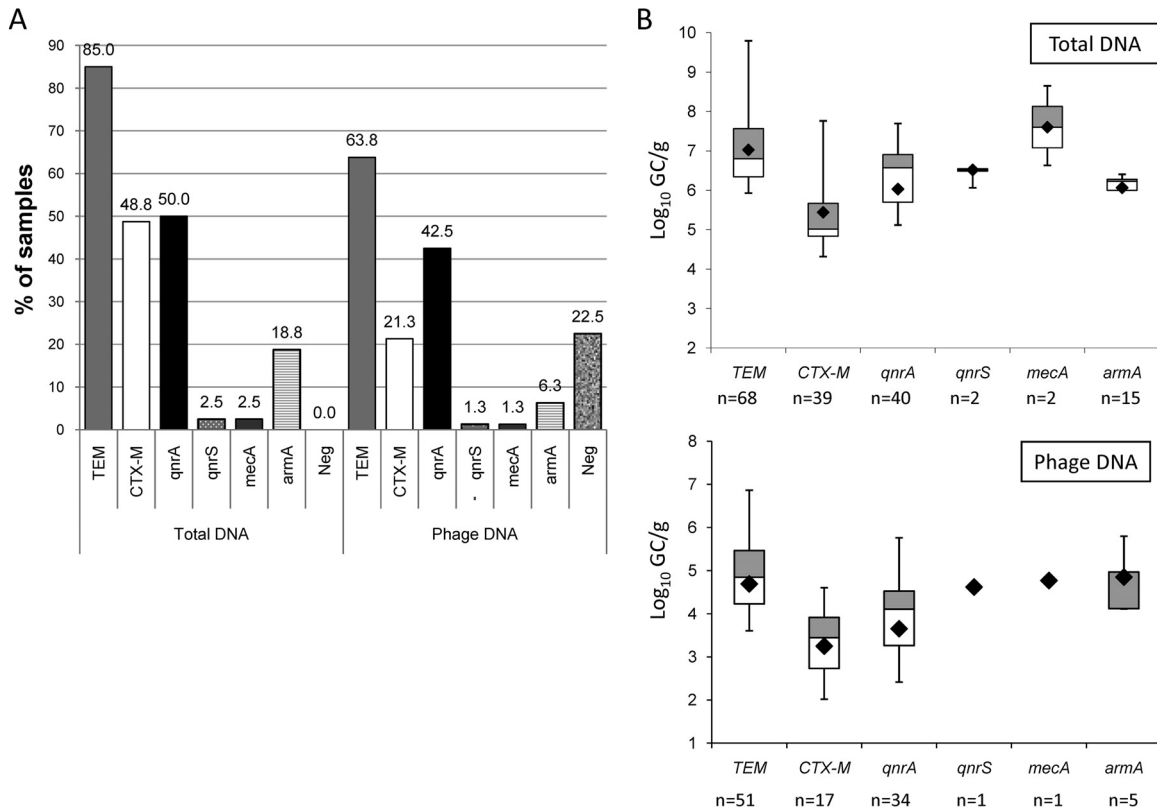


FIG 1 (A) Proportion of each ARG studied among 80 samples in total and phage DNA. In total DNA, values are expressed for 80 positive samples. In total DNA, all samples were positive for at least one ARG, while in phage DNA, 18 samples were negative for all ARGs (Neg). (B) Box plot chart with the averaged values obtained from all ARGs in positive samples for total and phage DNA. Within the box plot chart, the cross-pieces of each box plot represent (from top to bottom) maximum, upper quartile, median (horizontal black bar), lower quartile, and minimum values. A black diamond indicates the mean value. The gray boxes in the box plot chart include samples showing values within the 75th percentile, and white boxes include samples showing values within the 25th percentile. n, number of positive samples for each ARG.

screen for PCR inhibition, dilutions of the standard of each gene were spiked with the DNA isolated from the samples, and the results were compared to the true number of GC of the target genes in the standards. No inhibition of the PCR by the samples was detected. Sequencing was performed as previously described (16).

When the ARGs in the total DNA were analyzed, all samples were positive for one or more ARGs (Fig. 1A). When purified phage DNA was used, 22.5% of the samples were negative for all ARGs and 77.5% harbored one or more ARGs. All the ARGs analyzed were present in our samples, and the distribution of the ARGs in phage DNA was found to follow the same order of prevalence as in total DNA (Fig. 1A). No correlation was found between the patient's age or gender and the presence of ARGs in total or phage DNA.

When the different ARGs found were quantified per gram of fecal sample (Fig. 1B), the highest values were seen in total DNA with differences in \log_{10} units between total and phage DNA ranging from 1.2 for *armA* to 2.8 for *mecA*. In phage DNA, *bla*_{TEM} showed the highest prevalence and abundance, with values as high as 6.8 \log_{10} GC/g. The second most prevalent gene was *qnrA*. *bla*_{CTX-M group1} was the third most prevalent gene, although the densities were lower than those of the two previous ARGs. *armA* showed a low prevalence of only five positive samples but remarkably high densities (up to 6 \log_{10} units). There were a small num-

ber of samples positive for *qnrS* and *mecA* in phage DNA, which did not allow us to draw conclusions regarding their abundance.

The prevalence of the genes in this study corroborates the descriptions found in the literature. *bla*_{TEM} is probably the most prevalent ARG worldwide (21, 22) and in phage DNA in wastewater (15, 16). *bla*_{CTX-M-1 group} includes *bla*_{CTX-M-15}, which over the past decade has become one of the most prevalent extended-spectrum beta-lactamase genes (23). The horizontally transferable *qnrA* and *qnrS* genes (24, 25) are widely distributed in our region and clinically relevant (20), particularly *qnrA*, which was the first quinolone resistance gene described and the most commonly found (26, 27). *armA* is also highly prevalent in *Enterobacteriaceae*, and it is spreading worldwide (19, 28, 29). *mecA* was not prevalent in this study, perhaps because *Staphylococcus* spp. are not commonly found in the intestinal tract. The previous detection of *mecA* in phages from sewage (16) may be attributable to a nonfecal origin.

The qPCR assays produce a short amplicon, and to better confirm the identity of the ARGs detected in phage DNA by sequencing, we amplified longer fragments by conventional PCR. Sequencing was performed with forward and reverse primers and in duplicate. The consensus of all sequences generated fragments of different sizes for *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M group1}, *qnrA*, and *qnrS* that matched 100% previously described sequences of the corresponding ARGs from different bacterial genera available in the GenBank

TABLE 1 Sequence homology of some of the ARGs amplified from phage DNA of fecal samples^a

Fragment size (bp)	ARG assay result	First sequence homologue	GenBank accession no.
574	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{TEM-1}	GQ470444.1
571	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{TEM-1}	JN002397.1 AY832935.1
580	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{TEM-116}	NZ_ADUR01000022 NZ_ADF01000030 AY265885.1 JF327796.1
576	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{TEM-1}	JN002397.1 AY832935.1
386	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	JX129219.1
380	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-15-like}	KC107824.1
		<i>bla</i> _{CTX-M-33}	AY238472.1
360	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-15-like}	KC107824.1
		<i>bla</i> _{CTX-M-114}	GQ351346.1
359	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	NC_013122.1
359	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-33}	AY238472.1
		<i>bla</i> _{CTX-M-15}	JX129219.1
359	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-109}	JF274248.1
		<i>bla</i> _{CTX-M-33}	AY238472.1
355	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	EF158301.1
		<i>bla</i> _{CTX-M-15}	EU979556.1 HQ256746.1
412	<i>mecA</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15-like}	JX268658.1
437		<i>mecA</i>	KC243783.1
466			JQ764731.1
436			HE978800.1 HE978798.1 GU301100.1 GU301101.1
452	<i>qnrA</i>	<i>qnrA1</i>	JN687470.1
			JF728153.1
			JF969163.1
			HQ184955.1
			GU324551.1
456	<i>qnrA</i>	<i>qnrA1</i>	JN687470.1
			JF728153.1
			JF969163.1
			GQ891753.1
			GU295955.1
352	<i>qnrS</i>	<i>qnrS2</i>	HE616910.2
			JN315883.1
			JF773350.1
			DQ485530.1

^a The fragment size corresponds to the length of the consensus sequence generated with the forward and reverse sequences of the PCR amplicon, performed in duplicate, and is the fragment used to search for homologies. No PCR amplicon was obtained for the *armA* gene with the samples that showed positive for this ARG.

database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>) (Table 1). *armA* was not amplified by conventional PCR in the few samples that tested positive for this gene. The specific variant of the ARG sequenced was not determined because of the length and location of some of these fragments and because the limited amount of DNA obtained from the samples did not allow the amplification of the complete ARGs.

The high prevalence of ARGs in phage DNA isolated from fecally polluted environments (14–16) indicates that phages could play a role in the mobilization of ARGs. The question we address here is whether the origin of these phages could be free phage

particles excreted in feces, free phages present in those environments, or phages induced from bacteria (allochthonous or autochthonous) occurring in those environments. The results of the present study clearly indicate that free phages encoding ARGs are directly excreted from healthy individuals via feces. The phage particles could be infectious or not to a given host, but as previously shown, the genes harbored by the phages are functional and able to confer resistance to a given antibiotic (16). This would make it likely that a phage harboring ARGs infects a new host and transfers the ARG that could be incorporated into the host genome by recombination.

The significant prevalence of phages in human feces has been shown by recent metagenomics studies (30–32). Among these, many remark on the high number of sequences of ARGs in the virome fraction of the human gut (17, 33). A recent report indicates that the number of ARGs in the “phageome” is significant and that the ARG content in the phage DNA fraction of the gut microbiome increases after antibiotic treatment (34). Specific phages could carry ARGs of Gram-positive (4–6) and Gram-negative (7–10) bacteria. Although these reports do not indicate the nature of the phage particles, some authors suggest that they could have been generated by means of generalized transducing phages that can mobilize chromosomal genes and plasmids (4, 8, 35).

As phages harboring ARGs are excreted in human feces from healthy individuals (or animals) (14–16), there must be many of these phages circulating in the population. These phages probably exist in some food and water, but they will not normally be detected by regular quality controls. They could be ingested as free particles and cause conversion of susceptible hosts within the gut that could be later selected by the presence of antimicrobial agents. At present, phages seem to be suitable vehicles for the mobilization and transmission of ARGs, and probably many other genes, in both intra- and extraintestinal environments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. González-Zorn for the construct containing the *armA* gene used for the qPCR standards.

This study was partially supported by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2012-30880), by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), by a project of the RecerCaixa program (La Caixa), and by the Fundación Ramon Areces and was partially supported by the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). Marta Colomer-Lluch has a grant FI from the Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- Lupo A, Coyne S, Berendonk TU. 2012. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front. Microbiol.* 3:18. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00018>.
- Zhang XX, Zhang T, Fang HH. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:397–414. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z>.
- Ubukata K, Konno M, Fujii R. 1975. Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28:681–688. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.28.681>.
- Schuch R, Fischetti VA. 2006. Detailed genomic analysis of the beta and gamma phages infecting *Bacillus anthracis*: implications for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 188:3037–3051. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.188.8.3037-3051.2006>.
- Mazaheri Nezhad Fard R, Barton MD, Heuzenroeder MW. 2011. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in Enterococci. *Letts. Appl. Microbiol.* 52:559–564. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03043.x>.

6. Varga M, Kuntová L, Pantůček R, Mašlaňová I, Růžičková V, Doškač J. 2012. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol. Lett.* 332:146–152. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02589.x>.
7. Blahová J, Hupková M, Krcmery V, Schäfer V. 1992. Imipenem and cefotaxime resistance: transduction by wild-type phages in hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Chemother.* 4:335–337.
8. Willi K, Sandmeier H, Kulik EM, Meyer J. 1997. Transduction of antibiotic resistance markers among *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains by temperate bacteriophages Aa phi 23. *Cell. Mol. Life Sci.* 53:904–910. <http://dx.doi.org/10.1007/s000180050109>.
9. Schmieger H, Schickmaier P. 1999. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:251–256. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13381.x>.
10. Oliver A, Coque TM, 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.* 49:1567–1571. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.4.1567-1571.2005>.
11. American Academy of Microbiology. 2009. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem. A report from the American Academy of Microbiology. American Academy of Microbiology, Washington, DC.
12. Cangelosi GA, Freitag NE, Buckley MR. 2004. From outside to inside: environmental microorganisms as human pathogens. American Academy of Microbiology, Washington, DC.
13. Brabban AD, Hite E, Callaway TR. 2005. Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathog. Dis.* 2:287–303. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2005.2.287>.
14. Muniesa M, García A, Miró E, Mirelis B, Prats G, Jofre J, Navarro F. 2004. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1134–1137. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1006.030472>.
15. Colomer-Lluch M, Imamovic L, Jofre J, Muniesa M. 2011. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4908–4911. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00535-11>.
16. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. 2011. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 6:e17549. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>.
17. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. 2011. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 21:1616–1625. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.122705.111>.
18. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
19. González-Zorn B, Catalan A, Escudero JA, Domínguez L, Teshager T, Porrero C, Moreno MA. 2005. Genetic basis for dissemination of *armA*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:583–585. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki246>.
20. Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM, Carattoli A, Prats G. 2008. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:291–295. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm448>.
21. Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, Tórtola T, Mirelis B, Navarro G, Cuenca M, Esteve M, Peña C, Llanos AC, Cantón R, Pascual A. 2008. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch. Intern. Med.* 168:1897–1902. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.168.17.1897>.
22. Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, Pascual A, Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). 2010. The diversity of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J. Clin. Microbiol.* 48:2840–2845. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02147-09>.
23. Cantón R, Coque TM. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:466–475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>.
24. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J. Infect. Chemother.* 17:149–182. <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-010-0120-2>.
25. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* 6:629–640. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70599-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70599-0).
26. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahn DF, Jacoby GA, Hooper DC. 2006. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2872–2874. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01647-05>.
27. Nordmann P, Poirel L. 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:463–469. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki245>.
28. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. 2005. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2949–2953. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.7.2949-2953.2005>.
29. Granier SA, Hidalgo L, San Millan A, Escudero JA, Gutierrez B, Brisabois A, Gonzalez-Zorn B. 2011. *ArmA* methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5262–5266. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00308-11>.
30. Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, Rohwer F. 2003. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J. Bacteriol.* 185:6220–6223. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.20.6220-6223.2003>.
31. Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, Gordon JI. 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466:334–338. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09199>.
32. Stern A, Mick E, Tirosh I, Sagy O, Sorek R. 2012. CRISPR targeting reveals a reservoir of common phages associated with the human gut microbiome. *Genome Res.* 22:1985–1994. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.138297.112>.
33. Wang X, Kim Y, Ma Q, Hong SH, Pokusaeva K, Sturino JM, Wood TK. 2010. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat. Commun.* 1:147. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1146>.
34. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. 2013. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. 2013. *Nature* 499:219–222. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12212>.
35. Schickmaier P, Moser E, Wieland T, Rabsch W, Schmieger H. 1998. A comparative study on the frequency of prophages among natural isolates of *Salmonella* and *Escherichia coli* with emphasis on generalized transducers. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:49–54. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1000748505550>.

4.2. CAPÍTULO 2

Los bacteriófagos libres que codifican Stx1 son menos frecuentes que los bacteriófagos de la toxina Shiga 2 en ambientes extraintestinales.

LOS BACTERIÓFAGOS LIBRES QUE CODIFICAN PARA LA TOXINA SHIGA 1 SON MENOS FRECUENTES QUE LOS BACTERIÓFAGOS DE LA TOXINA SHIGA 2 EN AMBIENTES EXTRAIESTINALES.

Ferran Grau-Leal, **Pablo Quirós**, Alexandre Martínez-Castillo y Maite Muniesa.

Environmental Microbiology. 2015 Nov; 17(11):4790-801.

Introducción

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) son patógenos de notoriedad mundial transmitidos por alimentos (Riley *et al.*, 1983; Gyles, 2007). La toxina Shiga (Stx) es un factor causal del desarrollo del síndrome urémico hemolítico (en inglés *Hemolytic uremic syndrome*; HUS) (Tarr *et al.*, 2005). Existen dos tipos de Stx, la Stx1 y Stx2 con diferencias respecto a los tejidos u órganos que afectan, aunque en general ambas se unen al mismo receptor (Gb3) y son capaces de causar HUS. En los seres humanos, Stx2 se identifica como la forma más dañina y se asocia más frecuentemente al desarrollo de HUS que Stx1 (Boerlin *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2002). Stx1 presenta tres subtipos (Stx1a, c y d), mientras que Stx2 presenta siete subtipos (de Stx2a a Stx2g) (Scheutz *et al.*, 2012).

El operón Stx, compuesto por dos genes que codifican para las subunidades A y B, se encuentra en el genoma de los bacteriófagos Stx, que son ampliamente heterogéneos en su morfología, su estructura genética y su capacidad de infectar a una amplia gama de huéspedes (Muniesa and Schmidt, 2014). Cada nuevo fago Stx producido después de la inducción lleva una copia del *stx* en su genoma.

Los individuos infectados con cepas STEC excretan grandes cantidades de fagos Stx en las heces. De hecho, los fagos Stx2 han sido reportados en heces de seres humanos sanos (Martínez-Castillo *et al.*, 2013), en alimentos (Imamovic *et al.*, 2009) y en ambientes contaminados fecalmente (Muniesa and Jofre, 2000, Tanji *et al.*, 2003, Dumke *et al.*, 2006, Imamovic *et al.*, 2010a, Rooks *et al.*, 2010, Yan *et al.*, 2011). Sin embargo, hay muy poca información disponible sobre la abundancia de fagos Stx1 libres.

Objetivos

En este estudio, desarrollamos un método para detectar y cuantificar fagos Stx1 libres y utilizar dicho método para evaluar su abundancia en un amplio conjunto de muestras medio ambientales, fecales y de alimentos. La abundancia de fagos Stx1 libres se compara entonces con la abundancia de fagos Stx2 libres.

Resultados y discusión

Validación de la qPCR de *stx*₁

La qPCR para *stx*₁ presentó una eficiencia del 98,6 % y un límite de detección de 8,1 CG/ μ l (Ct > 34,53). Fue validada usando cepas salvajes de *E. coli* positivas solo para *stx*₁, solo para *stx*₂ o cepas positivas para ambos genes. También se testó con cepas de laboratorio no STEC, con una cepa de *E. coli* conteniendo *stx*₁ clonado en un vector pGEM-T-Easy, y con distintas cepas de *Shigella* (Figura 1). El gen *stx*₁ fue detectado en todas las cepas *stx*₁ positivas, y en cuanto a las cepas de *Shigella*, solo presentó señal para *Shigella dysenteriae*. Stx1 solo difiere de la Stx de *S. dysenteriae* en un aminoácido.

Inducción de los fagos Stx1

Para cuantificar el ADN fágico bajo condiciones de inducción, y para evaluar como controles las partículas fágicas Stx1, se usaron las cepas D259, D408, D728, D745 y D830 (Tabla 1), que contenían sólo *stx*₁. Estas cepas se seleccionaron porque mostraban una disminución de la densidad óptica (DO₆₀₀) de los cultivos después del tratamiento con un agente inductor, por lo que se sospechaba que se inducían los fagos Stx1. Todas estas cepas mostraron una tasa moderada de inducción fágica espontánea (de $4,23 \times 10^5$ a $3,17 \times 10^6$ GC ml⁻¹ de lisado de fago) en los controles no tratados. Se observaron diferencias significativas (P < 0,05) en el número de copias *stx*₁ (CG) en el ADN fágico entre las cepas de control no inducidas y las cepas tratadas con mitomicina C o EDTA (Figura 2). En el ADN fágico las cepas D408, D745 y D830 mostraron el mayor incremento en el número de copias *stx*₁ (por encima de 10^8 GC ml⁻¹); Mientras que las cepas D259 y D728 mostraron niveles de inducción más bajos (Figura 2), por lo que estas dos cepas no se incluyeron en los estudios de microscopía.

Diferencias significativas (P < 0.05) en la inducción del fago también se observaron entre el tratamiento con mitomicina y EDTA. La mitomicina C activa el ciclo lítico del fago, mientras que el potente efecto inductor del EDTA sobre los fagos Stx2 se atribuyó a sus propiedades quelantes, de hierro y otros cationes (Imamovic and Muniesa, 2012), aunque los mecanismos moleculares y la vía de la inducción de EDTA aún no se han aclarado. Como se describe más adelante, el agotamiento de hierro aumenta la expresión de Stx1 independientemente de la inducción del fago (Calderwood and Mekalanos, 1987). Debido a que el mecanismo del EDTA no es bien conocido y no se puede confirmar que no hubiera interferencia de la quelación del catión en la unión del fago a la célula bacteriana, el siguiente conjunto de estudios utilizó sólo los lisados de fagos obtenidos después del tratamiento con mitomicina C.

Correlación de los resultados entre qPCR, infectividad y partícula fágicas

El rendimiento de la qPCR se evaluó comparando los resultados de CG en el ADN de fago con observaciones directas de partículas de fago usando microscopía electrónica. Por tanto, los fagos Stx1 inducidos de las cepas D408, D745 y D830 se purificaron mediante gradientes de densidad de CsCl. Los gradientes de CsCl mostraron una sola banda con una densidad flotante de 1,4-1,5 g/cm³, lo que sugiere un solo tipo de virus dentro de las densidades de Caudovirales (Taxonomía de Virus, 2011). Se recogió la única banda y se utilizó para evaluar la infectividad del fago, microscopía electrónica y ensayos de qPCR.

Sólo los fagos ϕ 408 y ϕ 745 inducidos de las cepas D408 y D745, respectivamente, eran capaces de producir señales visibles en la membrana de hibridación. Los mayores recuentos se obtuvieron en *E.*

coli WG5 como cepa huésped. También se observaron aunque en menor número usando otras cepas de *E. coli* (C600 y DH5 α) y la cepa *Shigella sonnei* 866 como huéspedes. Sin embargo, la infección sin la existencia de calvas de lisis visibles es posible y puede conducir a la generación de lisógenos.

Para correlacionar los valores obtenidos por qPCR con el número real de partículas de fago, las partículas de fago purificadas fueron sometidas a recuento de partículas virales por microscopía electrónica de transmisión usando esferas de látex con una concentración conocida como referencia (Crocker and Bennett, 1952; Imamovic *et al.*, 2010b).

Las rejillas de microscopía electrónica se prepararon con una mezcla que contenía $1,82 \times 10^{10}$ esferas ml^{-1} y con los fagos a concentraciones desconocidas de $\phi 408$, $\phi 745$ y $\phi 830$. Los tres lisados de fagos mostraron morfología *Myoviridae*.

Los números obtenidos con las esferas de látex son ligeramente superiores a los obtenidos por qPCR (Tabla 2), como se observó en estudios previos (Imamovic *et al.*, 2010b). Esto podría deberse al hecho de que la microscopía electrónica permite la visualización de partículas de fago vacías o defectuosas que llevan ADN incompleto o degradado que no sería detectado por qPCR.

Los recuentos directos por microscopía no son fiables para la enumeración de fagos en muestras naturales y el ensayo de infectividad es demasiado dependiente tanto de la cepa huésped como de las capacidades líticas de los fagos, que han demostrado ser muy limitadas para los fagos Stx. El número de partículas infecciosas obtenido en nuestros experimentos fueron consistentemente más bajos que los números obtenidos por qPCR.

La qPCR es por tanto una herramienta muy útil para cuantificar fagos Stx libres.

Análisis de muestras ambientales

Mediante el ensayo de qPCR se analizaron un total de 357 muestras de diferentes ambientes para determinar la presencia o ausencia de fagos Stx1 y su abundancia. Los resultados indican una prevalencia muy baja (7,6%) de positivos (Tabla 3).

El mayor número de fagos Stx1 con un valor medio de 3×10^3 GC ml^{-1} se encontró en agua residual de aves de corral (Figura 4, Tabla suplementaria S2). En muestras sólidas, dos muestras de heces de ganado y dos muestras de ensalada fueron positivas para fagos Stx1. Las aguas residuales de aves de corral, con el 41,7% de las muestras positivas, y el agua del río, con el 20% de muestras positivas, mostraron la mayor presencia de fagos Stx1. Como apunte, las cuatro muestras positivas de agua de río fueron recolectadas después de un período de lluvia, cuando el caudal del río aumenta y los sedimentos del río, que son un reservorio de microorganismos, se resuspenden (Fries *et al.*, 2008). En cuanto al mayor porcentaje de muestras positivas de aves de corral, no hay una explicación clara. Sin embargo, se ha reportado una alta incidencia de Stx1 en *E. coli* patógenas de aves (Parreira and Gyles, 2002, Murinda *et al.*, 2004), lo que podría explicar una mayor cantidad de fagos Stx1 libres en estas muestras.

Los resultados de fagos Stx1 libres se compararon con la prevalencia de fagos Stx2 analizados *de novo* en este estudio o reportados previamente por nuestro grupo en el mismo tipo de muestras

(Imamovic *et al.*, 2010a, Imamovic and Muniesa, 2011; Martínez-Castillo *et al.*, 2013), (Tabla 3). La prevalencia del 7,6% de los fagos Stx1 contrastaba con el 68,4% de los fagos Stx2. Aunque comparten muchas características, los fagos que codifican Stx1 y Stx2 también muestran varias diferencias y, entre otras, las diferencias en las condiciones de expresión del gen de la toxina. La producción de Stx1, pero no la de Stx2, se ve afectada por el hierro (Calderwood and Mekalanos, 1987, De Grandis *et al.*, 1987). Esto se debe a que los promotores para la expresión de fagos Stx1 y Stx2 difieren. Existen dos promotores para la Stx1, un promotor dependiente de la inducción del fago y uno independiente, justo aguas arriba del gen *stx*₁ que contiene un sitio de unión para la proteína Fur, que posee a su vez un lugar de unión con el hierro. En presencia de hierro, Fur se une al ADN y bloquea la transcripción de *stx*₁. Por lo tanto, la producción de Stx1 podría ser regulada en respuesta a señales derivadas del huésped, tales como baja concentración de hierro, y no depende tanto de la inducción del fago Stx1 (Ritchie *et al.*, 2003; Steyert *et al.*, 2012). Como consecuencia, Stx1 se encuentra en la fracción periplásmica de las células más que en el sobrenadante de los cultivos (Shimizu *et al.*, 2007), ya que al no depender de la inducción del fago y no hay lisis celular. Por el contrario, la producción de Stx2 es altamente dependiente de la inducción del fago Stx2 por parte de agentes inductores, tales como la mitomicina C, y por esto Stx2 se encuentra más comúnmente en los sobrenadantes de los cultivos ya que se libera tras la lisis celular mediada por el fago.

La expresión de Stx en STEC es una ventaja adaptativa como defensa contra protozoos en su reservorio original en rumiantes (Steinberg and Levin, 2007; Arnold and Koudelka, 2014). La presión selectiva debería haber seleccionado cepas que albergan fagos Stx2 inducibles, ya sea espontáneamente o por la acción de agentes inductores, porque la inducción del fago es un prerrequisito para expresar la toxina que necesitan. Esta presión selectiva debe haber sido más suave para cepas que albergan fagos Stx1, ya que éstos no requieren inducción de fagos para expresar Stx1, y como consecuencia hay menos cepas productoras de Stx1 con fagos inducibles. Como consecuencia, existen menos fagos Stx1 liberados por inducción y podría ser el motivo por el que se detectan menos circulando en el medio ambiente.

Aunque nuestro estudio mide solamente el ADN del fago y no la expresión de Stx1. Las implicaciones de esta menor prevalencia incluyen una menor frecuencia esperada de transducción de *stx*₁, ya sea en entornos intraintestinales o extraintestinales, y una menor tasa de lisis mediada por fagos de las cepas que albergan sólo un fago Stx1, lo que podría mejorar su supervivencia. Debido a la mayor prevalencia y abundancia de los fagos Stx2, las tasas de transducción de *stx*₂ en el medio ambiente deberían ser mayores que las de *stx*₁ y por lo tanto más probable la aparición de nuevas cepas productoras de Stx2. Desde un punto de vista evolutivo, es tentador especular que los fagos Stx2 han evolucionado a partir de los fagos Stx1, y que los fagos Stx2 han adquirido mecanismos para lograr una propagación más exitosa, lo que a su vez contribuye a una mayor expresión de Stx2 y en consecuencia a generar cepas más virulentas capaces de provocar HUS.

Free Shiga toxin 1-encoding bacteriophages are less prevalent than Shiga toxin 2 phages in extraintestinal environments

Ferran Grau-Leal[†], Pablo Quirós[†],
Alexandre Martínez-Castillo and Maite Muniesa*
Department of Microbiology, University of Barcelona,
Diagonal 643, Annex, Floor 0, Barcelona, E-08028,
Spain.

Summary

Stx bacteriophages are involved in the pathogenicity of Stx-producing *Escherichia coli*. Induction of the Stx phage lytic cycle increases Stx expression and releases Stx phages that reach extracellular environments. Stx phage family comprises different phages that harbour any *stx* subtype. Stx2 is closely related with severe disease and therefore previous studies focused on free Stx2 phages in extraintestinal environments. To provide similar information regarding Stx1 phages, we evaluate free Stx1 phages in 357 samples of human and animal wastewater, faeces, river water, soil, sludge and food. Our method, based on quantification of *stx*₁ in the DNA from the viral fraction, was validated using electron microscopy counting of phages and infectivity. The overall prevalence of Stx1 phages was very low: 7.6% of positive samples and values below 3×10^3 GC (gene copies) ml⁻¹. These results contrast starkly with the abundance of Stx2 phages in the samples (68.4%). This environmental scarcity of free Stx1 phages is attributed to their lower rates of induction and the fact that Stx1 does not require phage induction to be expressed because it possesses an independent promoter. The implications of the low prevalence of free Stx1 phages for the emergence of new pathogenic strains in the environment are discussed.

Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are foodborne pathogens of worldwide notoriety (Riley *et al.*,

1983; Gyles, 2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* possess a large arsenal of virulence genes, with Shiga toxin (Stx) being the crucial factor attributed to the progression of haemolytic uremic syndrome (HUS; Tarr *et al.*, 2005). Stx can be classified into two major antigenic forms: Stx1 and Stx2. Despite having closely related primary amino acid sequences, Stx1 and Stx2 are immunologically distinct and do not target exactly the same tissues or organs, although both do bind the same receptor (Gb3) and are capable of causing HUS. In humans, Stx2 is identified as the more potent form and is more often associated with severe disease and the development of HUS than Stx1 is (Boerlin *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2002). Besides these two main types, the number of identified Stx subtypes is growing and efforts are being made to harmonize the different toxin designations (Scheutz *et al.*, 2012). Stx1 presents three subtypes (Stx1a, c and d) while Stx2 presents seven subtypes (from Stx2a to Stx2g) (Scheutz *et al.*, 2012). Although the molecular structures of Stx1 and Stx2 are similar (Fraser *et al.*, 2004), their cellular distributions are different: Stx1 is almost exclusively cell associated, whereas Stx2 is also often found in the extracellular fraction (Shimizu *et al.*, 2009).

The capacity to produce Stx is conferred on STEC by the Stx operon, which consists of two small genes that encode the AB₅ toxin. The Stx operon is located in the genome of temperate bacteriophages or Stx phages, which are broadly heterogeneous, not only in their morphology, but also in their genetic structure and capacity to infect a diverse range of hosts (Muniesa and Schmidt, 2014). The *stx* genes, coding either for Stx1 or for Stx2 phages, are found within the late genes of Stx phage genome (Plunkett *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2003; Kreuzburg *et al.*, 2005a,b; Zhang *et al.*, 2007; Strauch *et al.*, 2008), and *stx* genes transcribe from the late phage promoter together with lysis and morphogenesis genes following prophage induction (Wagner and Waldor, 2002; Tyler *et al.*, 2004). Each new Stx phage produced after induction carries one copy of the *stx* gene in its genome.

STEC strains isolated from food and animals carry inducible Stx phages (Muniesa *et al.*, 2004a; Sekse *et al.*, 2008; Beutin *et al.*, 2013). Those individuals infected with

Received 29 April, 2015; revised 31 August, 2015; accepted 11 September, 2015. *For correspondence. E-mail: mmuniesa@ub.edu; Tel: +34934039386; Fax: +34934039047. [†]Both authors contributed equally to this study.

STEC strains should shed large quantities of *Stx* phages in faeces and therefore *Stx* phages occur in the environment outside the gut, as other viruses transmitted by the faecal–oral route do (Fong and Lipp, 2005). Indeed, *Stx2* phages have been reported in faeces from healthy humans (Martinez-Castillo *et al.*, 2013), in food (Imamovic *et al.*, 2009) and in faecally polluted environments (Muniesa and Jofre, 2000; Tanji *et al.*, 2003; Dumke *et al.*, 2006; Imamovic *et al.*, 2010a; Rooks *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2011). There is, however, very little information available regarding the occurrence of free *Stx1* phages. In this study, we develop a method to detect and quantify free *Stx1* phage particles and use it to evaluate the abundance of *Stx1* phages in a broad set of environmental, faecal and food samples. The abundance of free *Stx1* phages is then compared with the reported abundance of free *Stx2* phages.

Results and discussion

Validation of the *stx1* qPCR assay

The qPCR assay was shown to have an efficiency of 98.6% (Fig. 1), and showed a detection limit of 40.6 GC per tube or 8.1 GC μl^{-1} ($\text{Ct} > 34.53$). It was validated using wild-type (wt) strains of *E. coli* containing *stx1* only, *stx2* only or strains containing both genes, as well as with non-STEC laboratory strains, with an *E. coli* strain containing *stx1* cloned in the pGEM-T-Easy vector (Promega) and with *Shigella* strains (Table 1). The variants of the *Stx1* and *Stx2* toxin present in the strains were evaluated by PCR using previously described primers (Scheutz *et al.*, 2012) and confirmed by sequencing.

Validation was performed with DNA extracted from cultures containing 10^6 – 10^7 ufc ml^{-1} (0.1 ml of cultures with an OD_{600} of 0.3). The *stx1* gene was detected when ana-

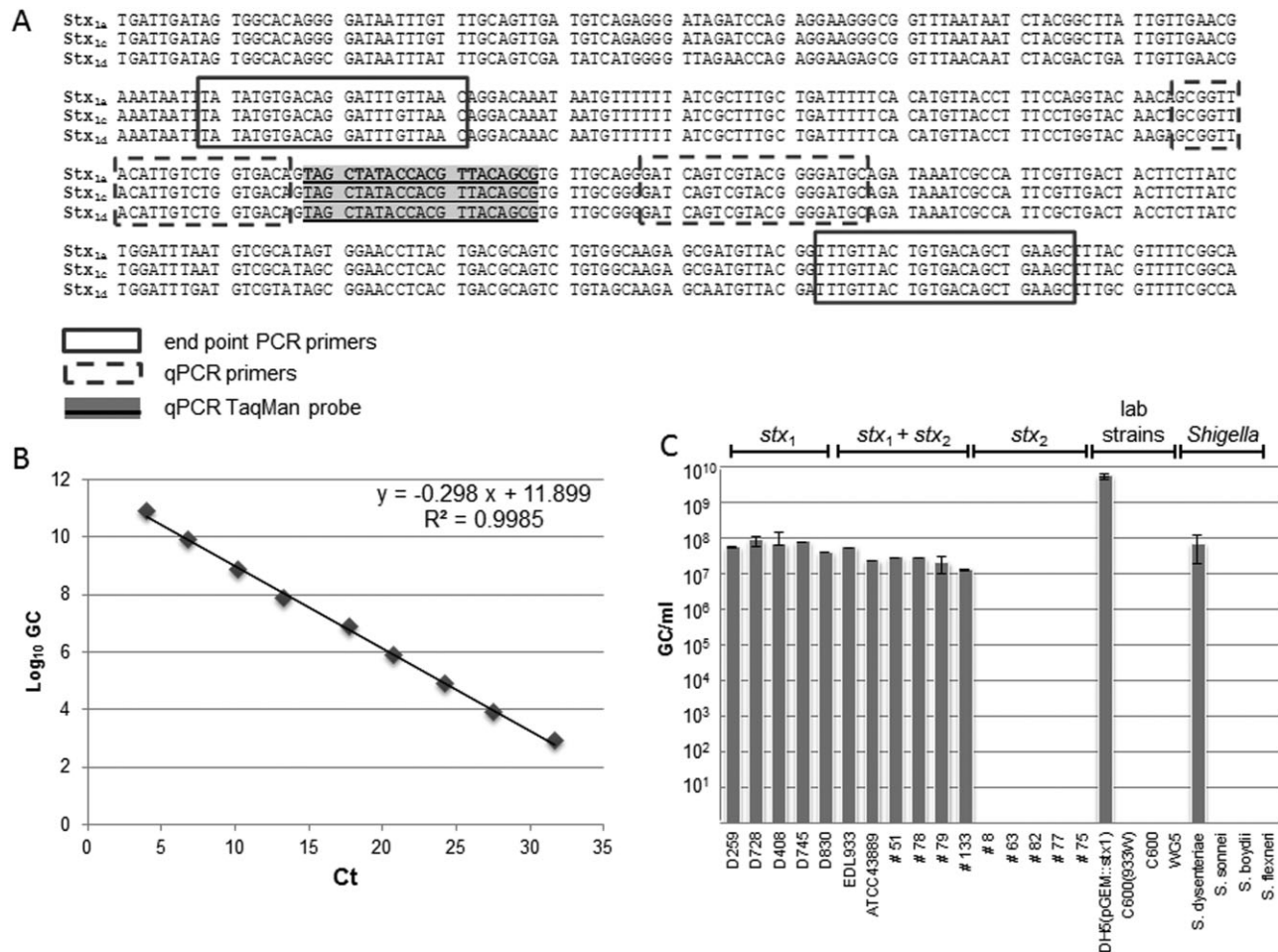


Fig. 1. *stx1* qPCR assay. (A) Location of primers and probes designed for the end-point and qPCR assay. (B) qPCR standard curve obtained with pGEM plasmid containing a fragment of *stx1*. Data are the average of three replicates in five independent experiments. (C) *stx1* GC obtained using DNA from bacterial cultures of *E. coli* strains possessing only *stx1*, *stx1* and *stx2*, only *stx2* or no *stx* and with different *Shigella* species.

Table 1. *Escherichia coli* and *Shigella* strains used in this study.

Strain	Serotype	Toxin subtype	Source or reference
<i>E. coli</i> wild-type strains			
D259	O103	<i>stx</i> _{1a}	EU Reference Laboratory VTEC
D408	O157:H7	<i>stx</i> _{1a}	EU Reference Laboratory VTEC
D728	O103	<i>stx</i> _{1a}	EU Reference Laboratory VTEC
D745	O26	<i>stx</i> _{1a}	EU Reference Laboratory VTEC
D830	O26	<i>stx</i> _{1a}	EU Reference Laboratory VTEC
EDL933	O157:H7	<i>stx</i> _{1a} + <i>stx</i> _{2a}	Wells <i>et al.</i> , 1983
ATCC 43889	O157:H7	<i>stx</i> _{1a} + <i>stx</i> _{2a}	American Type Culture Collection
#51	O146:H21	<i>stx</i> _{1a} + <i>stx</i> _{2d}	Martínez-Castillo <i>et al.</i> , 2012
#78	O166:H21	<i>stx</i> _{1c} + <i>stx</i> _{2c}	Martínez-Castillo <i>et al.</i> , 2012
#79	O90:H-	<i>stx</i> _{1c} + <i>stx</i> _{2d}	Martínez-Castillo <i>et al.</i> , 2012
#133	O90:H-	<i>stx</i> _{1c} + <i>stx</i> _{2d}	Martínez-Castillo <i>et al.</i> , 2012
#8	O146:H-	<i>stx</i> _{2a}	Martínez-Castillo <i>et al.</i> , 2012
#63	O171:H2	<i>stx</i> _{2c}	Martínez-Castillo <i>et al.</i> , 2012
#82	O171:H2	<i>stx</i> _{2c}	Martínez-Castillo <i>et al.</i> , 2012
#77	O90:H-	<i>stx</i> _{2d}	Martínez-Castillo <i>et al.</i> , 2012
#75	O2:H21	<i>stx</i> _{2e}	Martínez-Castillo <i>et al.</i> , 2012
<i>E. coli</i> laboratory strains			
DH5 α (pGEM:: <i>stx</i> _{1a})	–	<i>stx</i> _{1a}	This study
C600(933W)	–	<i>stx</i> _{2a}	Mühdorfer <i>et al.</i> , 1996
C600	–	–	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
WG5	–	–	Grabow and Coubrough, 1986
<i>Shigella</i> strains			
<i>Shigella dysenteriae</i>	–	<i>stx</i>	Clinical isolates
<i>Shigella sonnei</i>	–	–	Clinical isolates
<i>Shigella boydii</i>	–	–	Clinical isolates
<i>Shigella flexneri</i>	–	–	Clinical isolates

lysing *stx*₁-positive strains, either alone or in combination (Fig. 1), but it was never detected in those strains containing only the *stx*₂ gene, regardless of the subtype, or in *stx*-negative laboratory strains. Strain DH5 α (pGEM::*stx*₁) showed on average 2.2 (\pm 0.3) log₁₀ copies more than the other strains, in accordance with the multiple copies (from 300 to 500) of the vector, and therefore of *stx*₁, in the cells. In *Shigella* strains (Table 1), the qPCR assay detected the *Shigella* toxin gene in *S. dysenteriae*, but not in the other *Shigella* species. *Stx*₁ only differs from the *Stx* of *S. dysenteriae* in one amino acid; with *S. dysenteriae* being considered as the origin of Shiga toxins (Strockbine *et al.*, 1988).

Induction of *Stx*₁ phages

For quantification of phage DNA under induction conditions and as controls for enumeration of free *Stx*₁ phage particles, strains D259, D408, D728, D745 and D830 (Table 1), containing only *stx*₁, were used. These strains were selected because they showed a decrease in the optical density (OD₆₀₀) of the cultures after treatment with an inducing agent (data not shown), and therefore, they were suspected of being lysogenic for inducible phages. All these strains showed a moderated rate of spontaneous phage induction (from 4.23 \times 10⁵ to 3.17 \times 10⁶ GC ml⁻¹ of phage lysate) in the untreated controls. Significant (P < 0.05) differences in the number of

*stx*₁ copies (GC) in phage DNA were observed between the uninduced control strains and the strains treated with mitomycin C or EDTA (Fig. 2). Strains D408, D745 and D830 showed the highest increase in the number of *stx*₁

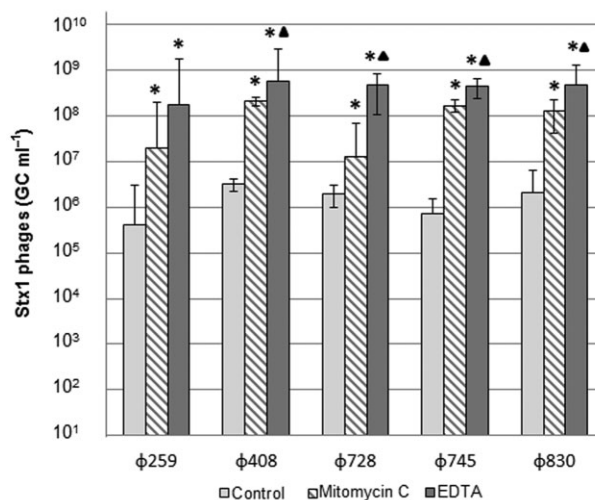


Fig. 2. *Stx*₁ phages evaluated by qPCR in lysates generated with *stx*₁ strains without inducing agent (control) or with mitomycin C and EDTA treatment 18 h after induction. Results are the average of three independent experiments. *Significant (ANOVA P < 0.05) differences between untreated culture versus mitC induction or between untreated culture versus EDTA induction. ▲Significant (ANOVA P < 0.05) differences between mitC and EDTA induction. Error bars show SD.

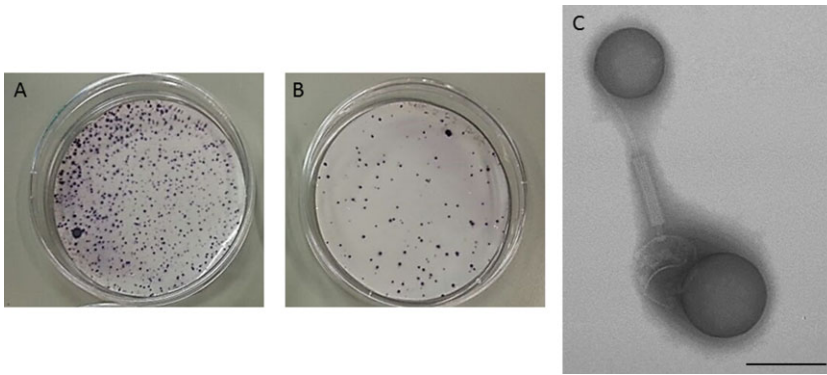


Fig. 3. (A and B) Plaque blot hybridization with DIG-labelled stxA1 probe of lytic plaques produced by two different dilutions of the ϕ 745 phage lysate onto *E. coli* WG5. (C) Electron micrograph showing a ϕ 745 phage next to 2 latex spheres. Scale bar: 100 nm.

copies in phage DNA (above 10^8 GC ml⁻¹), which is indicative of phage induction; while strains D259 and D728 showed lower levels of induction (Fig. 2), and therefore these two strains were not included in the microscopy studies. Differences in Stx1 phage numbers in the untreated cultures compared with those after mitomycin C treatment varied, however, between strains, with D259 and D728 showing the largest differences (Fig. 2).

Significant ($P < 0.05$) differences on phage induction were also observed between mitomycin and EDTA treatment except for strain D259 (Fig. 2). Mitomycin C activates the phage lytic cycle, while EDTA has recently been reported as a cause of a remarkable increase in Stx2 phage GC compared with uninduced controls (Imamovic and Muniesa, 2012). This effect of EDTA on Stx2 phages was attributed to its chelating properties, of iron and other cations (Imamovic and Muniesa, 2012). As discussed below, depletion of iron increases Stx1 expression independently of phage induction (Calderwood and Mekalanos, 1987). In addition to its plausible influence on Stx1 expression via the chelation of iron, which could be independent of phage induction, the fact is that EDTA had a clear effect on the propagation of Stx1 phages. However, as we already described for Stx2 phages (Imamovic and Muniesa, 2012), the molecular mechanisms and the pathway of EDTA induction have not yet been elucidated. Previous observations indicate that the induction mediated by EDTA is recA independent and that it should be related to the chelation of cations, which probably activates some pathways starting in the bacterial envelope (Imamovic and Muniesa, 2012). Because the mechanism is not well known and we cannot confirm there is no interference of cation chelation on the phage attachment to the bacterial cell, the next set of studies used only phage lysates obtained after mitomycin C induction.

Correlation of qPCR results with phage particles and infectivity

The performance of the qPCR assay was evaluated by comparing the results of GC in phage DNA with direct

observations of phage particles using electron microscopy. So, Stx1 phages induced from strains D408, D745 and D830 were purified by CsCl density gradients. The CsCl gradients showed a single band at a buoyant density of 1.4–1.5 g cm⁻³, which suggests the predominance of only one type of virus within densities corresponding to *Caudovirales* (Virus Taxonomy, 2011). The single band was collected and used to evaluate the phage infectivity, electron microscopy and qPCR assays.

The infectivity of the Stx1 phages assayed showed no clear lytic plaques of lysis and only phages ϕ 408 and ϕ 745 induced from strains D408 and D745, respectively, were capable of producing visible spots on the plaque blot membrane (Fig. 3A and B show membranes for phage ϕ 745), while phage ϕ 830, induced from strain D830, showed no sign of lytic plaques (plaque forming units, PFU ml⁻¹ in Table 2). The highest counts were obtained with *E. coli* WG5 as the host strain, but the same lack of lytic plaques or low numbers were observed using the other *E. coli* strains (C600 and DH5 α) and *Shigella sonnei* strain 866 as hosts. Differences in the production of lytic plaques depending on the host strain and the phage have previously been reported for Stx2 phages (James *et al.*, 2001; Imamovic *et al.*, 2010b), and it does not seem that Stx1 phages perform any better in terms of the generation of clear lytic plaques. Nevertheless, phage infection, even without phage lysis, can also lead to the creation of lysogens.

To correlate values obtained by qPCR with the real number of phage particles in the phage lysate, purified phage particles were subjected to viral particle counting by transmission electron microscopy using latex spheres from a stock of a known concentration of spheres (Crocker and Bennett, 1952; Imamovic *et al.*, 2010b). The electron microscopy grids were prepared with a mixture containing 1.82×10^{10} spheres ml⁻¹ and phages at unknown concentrations from the lysates of phages ϕ 408, ϕ 745 and ϕ 830. All three phage lysates showed particles corresponding to *Myoviridae* morphology, with an icosahedral capsid of 80 nm and a contractile tail 185 nm long and 18 nm wide (phage ϕ 745 in Fig. 3C).

Table 2. Validation of the qPCR assay by comparison of GC ml⁻¹ of the stock with phage particles counted by electron microscopy.

Strain	Replicate	Plaques (PFU ml ⁻¹)	qPCR (GC ml ⁻¹)	n° phage particles		
				n° spheres ml ⁻¹	Ratio (spheres/phages) ^a	n° phage particles ml ⁻¹
D408	1	8	1.2 × 10 ⁸	1.82 × 10 ¹⁰	28/1	6.5 × 10 ⁸
	2	6	1.6 × 10 ⁸	1.82 × 10 ¹⁰	26/1	7.0 × 10 ⁸
	3	7	3.4 × 10 ⁸	1.82 × 10 ¹⁰	30/1	6.1 × 10 ⁸
	Average	7	2.1 × 10 ⁸			6.5 × 10 ⁸
D745	1	9.3 × 10 ⁴	1.7 × 10 ⁸	1.82 × 10 ¹⁰	15/1	1.2 × 10 ⁹
	2	1.5 × 10 ⁴	2.2 × 10 ⁸	1.82 × 10 ¹⁰	14/1	1.3 × 10 ⁹
	3	1.8 × 10 ⁴	1.3 × 10 ⁸	1.82 × 10 ¹⁰	15/1	1.2 × 10 ⁹
	Average	4.2 × 10 ⁴	1.7 × 10 ⁸			1.2 × 10 ⁹
D830	1	ND	2.9 × 10 ⁸	1.82 × 10 ¹⁰	38/1	4.8 × 10 ⁸
	2	ND	7.6 × 10 ⁷	1.82 × 10 ¹⁰	25/1	7.2 × 10 ⁸
	3	ND	1.3 × 10 ⁷	1.82 × 10 ¹⁰	32/1	5.6 × 10 ⁸
	Average	ND	1.3 × 10 ⁸			5.9 × 10 ⁸

The estimation of the number of phage particles used the ratio (n° spheres/n° of phage particles) for each field and the number of spheres.ml⁻¹. Infectivity of Stx1 phages on *E. coli* WG5 was evaluated by plaque blot using a dig-labelled *stxA1* probe.

a. The ratio is the average of five fields.

The phages and latex spheres (Fig. 3C) were counted in five different fields in three independent phage lysates. The number of phage particles estimated using latex spheres as references are presented in Table 2. Comparison of GC values and the number of phage particles estimated by electron microscopy indicated that the assay detected most of the particles present in the lysate (Table 2). The numbers obtained by comparison with latex spheres are slightly higher than those obtained by qPCR, as observed in previous studies (Imamovic *et al.*, 2010b). This could be due to the fact that electron microscopy allows visualization of empty or defective phage particles carrying incomplete or degraded DNA that would not be detected by qPCR. Similarly, non-Stx1 phages sharing the same morphological type as well as generalized transducing particles containing bacterial DNA but not phage DNA would be detectable by microscopy but not by qPCR and should be considered. Electron microscopy is a valuable tool to verify the reliability of the qPCR technique and to confirm that the number of GC detected corresponds to real phage particles. Electron microscopy was used to enumerate viruses from environmental samples, but it is a laborious technique and allows only an estimation of the number of viral particles. Moreover, visualization of viruses by electron microscopy requires high phage titers (above 10⁸), that are not always present in natural samples. In addition, the technique cannot be applied to samples containing more than one viral morphotype and neither does it allow the target phages to be distinguished. Direct counts are not reliable for phage enumeration in natural samples and the plaque assay is too dependent on both the host strain and the lytic capacities of the phages, which have been shown to be severely limited for Stx phages. The numbers of infectious particles obtained in our experiments were consistently lower than the numbers obtained by qPCR. These results are attrib-

uted to the fact that not all the Stx phages released from their lysogen are infectious while infectivity is not evaluated in the qPCR procedure. In addition, the bacterial host strains used could be resistant to these phages. Moreover, and particularly for strain D745, the poor visibility of the plaques formed could lead to the underestimation of the real number of infectious Stx1 phages.

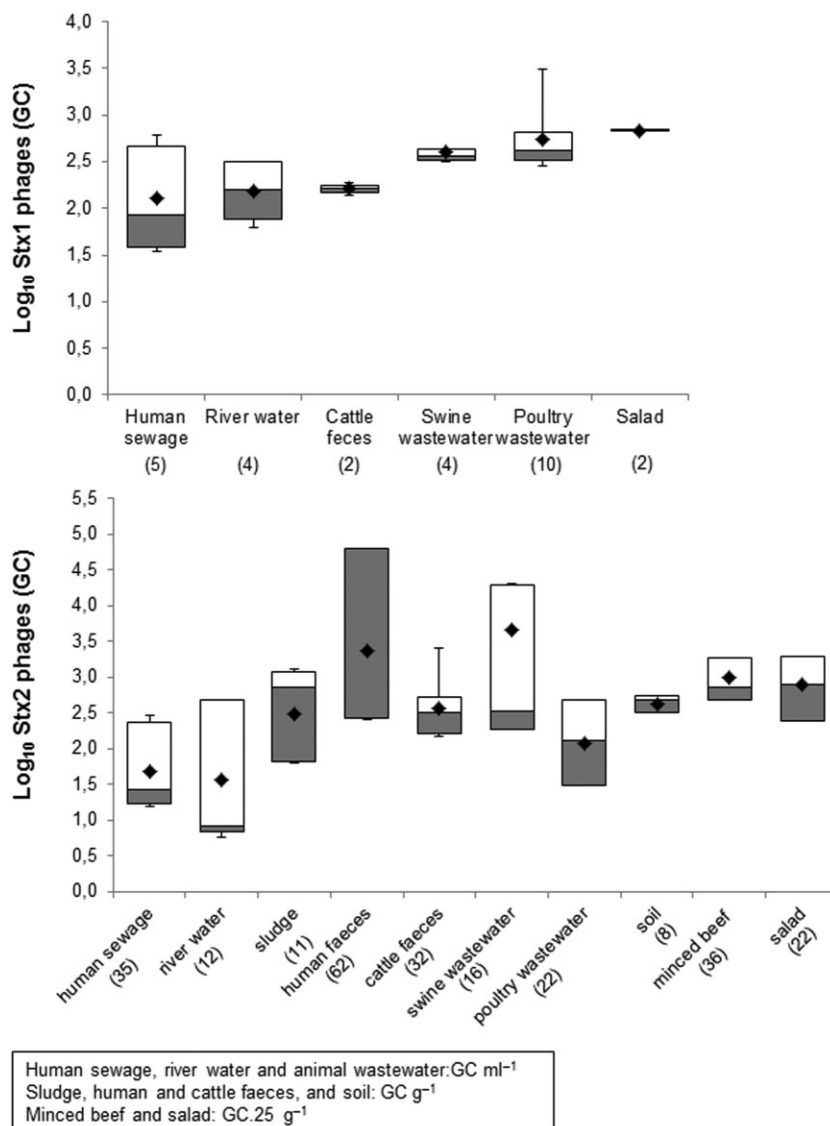
Considering this, a phage detection and enumeration method that does not rely on the plaque assay or direct visualization, such as qPCR, is a very useful tool to provide meaningful determinations of free Stx phages in extraintestinal samples. Even as the best approach at the present, the fact that the values obtained cannot easily be extrapolated to the number of real infectious particles is a limitation, for Stx phages just as for other viruses (Sobsey *et al.*, 1998; Imamovic *et al.*, 2010a).

Analysis of environmental samples

A total of 357 samples from different sources were analysed for the presence of Stx1 phages. The results indicate a very low prevalence (7.6%) of positive samples (Table 3). All the liquid samples (wastewater from humans and animals, and river water samples) showed the presence of Stx1 phages with maximum values of 3 × 10³ GC ml⁻¹ in poultry wastewater (Fig. 4; Supporting Information Table S2). In solid samples, two cattle faeces and two salad samples were positive for Stx1 phages. Poultry wastewater, with 41.7% of positive samples, and river water, with 20% of positive samples, showed the highest presence of Stx1 phages. Not all positive samples belonged to the same sampling point or slaughterhouse, suggesting that the source, and not the sampling point, should be correlated with the presence of Stx1 phages. As a consideration, the four positive river water samples were collected after a period of rain, when the river flow

Table 3. Comparison of the prevalence of Stx1 and Stx2 phages in extraintestinal samples.

Sample	Stx1 phages		Stx2 phages		Reference for Stx2 phages
	<i>n</i>	% of positive	<i>n</i>	% of positive	
Raw sewage	56	8.9	50	70.0	Imamovic <i>et al.</i> , 2010a
River water	20	20.0	20	60.0	This study
Sludge	21	0.0	21	52.0	This study
Human faeces	11	0.0	100	62.0	Martinez-Castillo <i>et al.</i> , 2013
Cattle faeces	36	5.5	37	89.2	Imamovic <i>et al.</i> , 2010a
Swine wastewater	29	13.8	18	88.9	This study and Imamovic <i>et al.</i> , 2010a
Poultry wastewater	24	41.7	24	91.7	This study and Imamovic <i>et al.</i> , 2010a
Soil	21	0.0	16	50.0	This study
Minced beef	66	0.0	36	100.0	Imamovic and Muniesa, 2011
Salad	73	2.7	32	68.7	Imamovic and Muniesa, 2011
Total	357	7.6	354	68.4	

**Fig. 4.** Box plot of averaged values of *stx1* gene copies in phage DNA (\log_{10} GC ml^{-1}) from the positive samples. Each box plot indicates the counts obtained for samples with the same source. The cross-pieces in each box plot represent (from top to bottom) the maximum, upper-quartile, median (black bar), lower-quartile and minimum values. The white boxes include samples showing values within the 75th percentile and the grey boxes samples showing values within the 25th percentile. The black diamond shows the mean value. In brackets is the number of positive samples.

increased and river sediments, which could be a reservoir of microorganisms, could have become resuspended (Fries *et al.*, 2008). Regarding the higher percentage of positive poultry samples, there is no clear explanation of these results. However, a high incidence of *stx₁* in avian pathogenic *E. coli* has been reported (Parreira and Gyles, 2002; Murinda *et al.*, 2004), which could account for a larger amount of free Stx1 phages in these samples.

In those samples where amplification of the 277 bp fragment of the *stx₁*-A subunit by conventional PCR was possible (total of 15 samples), the fragment was sequenced to confirm that the results obtained by qPCR corresponded to *stx₁*. The fragments obtained showed 100% similarity with previous *stx₁* sequences, which was expected considering that the primers were designed to amplify the conserved region of all *stx₁* subtypes.

The results for free Stx1 phages were compared with the prevalence of Stx2 phages analysed *de novo* in this study or reported previously by our group in the same sort of samples (Imamovic *et al.*, 2010a; Imamovic and Muniesa, 2011; Martínez-Castillo *et al.*, 2013; Table 3). The 7.6% prevalence of Stx1 phages contrasted with 68.4% for Stx2 phages. The few available reports showing the presence of Stx1 phages in swine faecal samples (Yan *et al.*, 2011) and in waste and river water (Dumke *et al.*, 2006) are in accordance with this lower prevalence of Stx1 phages.

Although they share many features, Stx1- and Stx2-encoding phages also display several differences, and among others, the toxin expression conditions are different. Stx1 production, but apparently not Stx2 production, is affected by iron (Calderwood and Mekalanos, 1987; De Grandis *et al.*, 1987). This is because the promoters for Stx1 and Stx2 expression in Stx-encoding phages are different. In both phages, there is a late promoter that regulates Stx phage lysis but, in addition, in Stx1 phages, there is a functional promoter adjacent to the *stx₁* gene (Calderwood and Mekalanos, 1987; Neely and Friedman, 1998). This Stx1 promoter contains a binding site for Fur protein, which complexes with iron. In the presence of iron, Fur binds to DNA and blocks transcription of *stx₁*. Therefore, Stx1 production could be regulated in response to host-derived signals, such as low iron concentration, and is not dependent on the late promoter of the Stx1-encoding phage, regardless of mitomycin C treatment (Ritchie *et al.*, 2003; Steyert *et al.*, 2012). The readthrough of transcription initiating at the Stx1 promoter might not result in sufficient expression of the downstream phage lysis genes of the Stx1-encoding phage (Shimizu *et al.*, 2009). Moreover, Stx1 release is enhanced by activation of phage lysis, but it is not entirely dependent on it, and it is similarly produced under conditions where the Stx1 phage is not induced (Wagner *et al.*, 2002). As a consequence, Stx1 is found in the periplasmic fraction of

cells more than in the supernatant of cultures (Shimizu *et al.*, 2007).

In contrast, Stx2 production is highly dependent on phage-inducing agents, such as mitomycin C, because prophage induction and the resulting transcription from the phage late promoter of the Stx2-encoding phage is essential for Stx2 expression (Wagner *et al.*, 2002), and the lysis of the cell is required for Stx2 release. These observations are in line with the fact that Stx2 is more commonly found in the supernatants of the cultures (unlike Stx1) and possibly released by the cells after spontaneous or induced phage-mediated lysis (Shimizu *et al.*, 2009).

Stx2-producing STEC isolates, either alone or in combination with Stx1, are more frequently associated with HUS than isolates that produce Stx1 alone (Griffin and Tauxe, 1991; Boerlin *et al.*, 1999). But pathogenicity in humans is a collateral effect of STEC in a host that is not its natural reservoir (Steinberg and Levin, 2007). If expression of Stx in STEC is an adaptive advantage that results in enhanced pathogenicity of these strains as a defence towards protozoa in their original reservoir in ruminants (Steinberg and Levin, 2007; Arnold and Koudelka, 2014), this selective pressure should have selected strains harbouring inducible Stx2 phages, either spontaneously or by the action of inducing agents. This selective pressure should have been milder for strains harbouring Stx1 phages that do not require phage induction to express Stx1. As a consequence, there are fewer Stx1-producing strains with inducible phages. Many studies have shown that many tested HUS-associated Stx1-producing isolates do not show phage induction after mitomycin C treatment (Ritchie *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2009), so it seems induction is not necessary to cause disease. Moreover, the rate of spontaneous Stx1 phage induction is lower than the rate of Stx2 phage induction in many EHEC isolates (Ritchie *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2007; McGannon *et al.*, 2010; Nassar *et al.*, 2013). Unfortunately, there are only few studies comparing the benefits of Stx1-producing *E. coli* towards protozoa, and although some advantages could be found, results are ambiguous (Steinberg and Levin, 2007).

Information in the literature is then in accordance with the lower prevalence of free Stx1 phages detected in this study and it provides a plausible explanation to our observations, although our study measures only phage DNA and not Stx1 expression. The implications of this lower prevalence include an expected lower frequency of *stx₁* transduction, either in intrainestinal or extraintestinal environments, and a lower rate of phage-mediated lysis of the strains harbouring only a Stx1 phage, which could enhance their survival. Because of the higher prevalence and abundance of Stx2 phages, the rates of *stx₂* transduction in the environment should be higher than

those of *stx*₁ and therefore more probable the emergence of new Stx2-producing strains. From an evolutionary point of view, it is tempting to speculate that Stx2 phages have evolved from Stx1 phages, and that Stx2 phages have acquired mechanisms that result in them spreading more successfully, which in turn contribute to higher Stx2 expression and more virulent consequences of EHEC infection, such as HUS.

Experimental procedures

Bacteriophages, bacterial strains, and media

E. coli wild-type (wt) strains containing only one *stx*₁ copy, one *stx*₁ copy and one *stx*₂ copy, or only one *stx*₂ copy (Table 1), together with laboratory *E. coli* and *Shigella* strains were used to validate the qPCR assay or the induction of Stx1 phages. *E. coli* DH5 α , *E. coli* C600 and *Shigella sonnei* strain 866 were used as hosts in the infection experiments (Imamovic *et al.*, 2010b). Bacterial strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth or agar. The medium was supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) when required.

Isolation of temperate bacteriophages and preparation of phage lysates

*stx*_{1a} wt strains (Table 1) were grown from single colonies in LB medium supplemented with 5 mM CaCl₂, at 37°C, to the exponential growth phase. Growth was measured with a spectrophotometer (Spectronic 501, Milton Roy, Belgium). At OD₆₀₀ = 0.3, mitomycin C (final concentration 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) or ethylenediaminetetraacetate (EDTA; final concentration 20 mM) were added. The cultures were then further incubated overnight in the dark (Muniesa *et al.*, 2004b). The treated cultures were then filtered through low-protein-binding 0.22 μm -pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA, USA) and treated with chloroform to avoid the presence of vesicles. Three independent lysates were prepared for each phage.

DNA extraction

To extract bacterial DNA, 200 μl of bacterial cultures at OD₆₀₀ = 0.4 were used with the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen Inc., USA) following the manufacturer's instructions.

For extraction of DNA from phage particles, the phage lysates were treated with DNase (100 units ml^{-1} of the phage lysate). An aliquot was taken and used as a template to be amplified by qPCR. This control was intended to confirm that non-packaged DNA was removed from the sample. DNA was isolated from phage lysates by proteinase K digestion and phenol/chloroform (1:1) (*v*:*v*) treatment (Sambrook and Russell, 2001). The mixture phenol/chloroform/phage was added to Phase Lock Gel tubes (5-Prime, Huco Erlöss, Madrid, Spain) and centrifuged following the manufacturer's instructions. Purified DNA was viewed by agarose (0.8%) gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The concentration of phage DNA was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

Standard PCR procedures

PCRs were performed with a GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain). A 277 bp fragment of the *stx*₁-A subunit was amplified from strain EDL933 using end-point PCR primers Stx1-up (5'-TATATGTGACAGGATTTGTTAAC-3') and Stx1-lp (5'-GCTTCAGCTGTCACAGTAACAAA-3'; Fig. 1). This fragment was used for the generation of the standard curve used in the qPCR. The primers used to determine the Stx1a, c and d subtypes are described elsewhere (Scheutz *et al.*, 2012). Primers for *stx*₂ amplification by standard PCR were as previously described (Imamovic *et al.*, 2010b).

qPCR procedures

A plasmid construct was used to generate standards for the *stx*₁ qPCR assay. The 277 bp fragment of the *stx*₁-A subunit obtained by conventional PCR was cloned with a pGEM-T-Easy vector, following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Barcelona, Spain). The construct was transformed by electroporation (2.5 kV, 25 F capacitance and 200 V resistance) into *E. coli* DH5 α electrocompetent cells. Immediately after electroporation, 1 ml of SOC medium (Sambrook and Russell, 2001) was added to the cuvette. The cells were recovered in SOC medium for 2 h at 37°C and plated in LB agar with ampicillin. Ampicillin-resistant colonies were confirmed using combinations of the end-point PCR primers for *stx*₁ and pGEM7up primer (3'-TGTAATACGACTCACTAT-5'; Promega Fitchburg, WI, USA) and by sequencing. The construct was purified using the Qiagen Plasmid Midi purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) and its concentration was quantified by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific).

The number of construct gene copies (GC) in the stock was calculated with the formula: (concentration of the construct/molecular weight) \times 6.023 $\cdot 10^{23}$ molecules mol^{-1} = n° molecules μl^{-1} (Smith *et al.*, 2006). Serial decimal dilutions of this stock were made in double-distilled water to prepare the standard curve for qPCR. This stock was amplified in triplicate in at least five independent experiments and the average threshold cycle (Ct) results were used to elaborate the standard, as described above. Three replicates of each dilution were added to each qPCR reaction in each assay.

A customer TaqMan (Applied Biosystems) set of primers and probe were designed from a DNA fragment of the *stx*₁, which is common to 1a, 1c and 1d subtypes (Fig. 1; Supporting Information Table S1). Primers Stx1up qPCR (5'-GCGGTTACATTGTCTGGTGACA 3') and Stx1lp qPCR (5'-GCATCCCCGTACGACTGATC 3'; 900 nM) and an *stx*₁ minor groove binding probe (5'-TAGCTATACCAGTTACAGCG -3'; 200 nM) with a FAM reporter and an NFQ quencher, were used under standard conditions in a Step One RT PCR System (Applied Biosystems). *stx*₁ was amplified in a 20 μl reaction mixture with the PCR Master Mix (Applied Biosystems). The reaction contained 1 or 9 μl of the DNA sample or quantified plasmid DNA. All samples were run in triplicate, as well as the standards and negative controls. GC was defined as the average of the triplicate data obtained.

A customer TaqMan real-time qPCR assay for *stx*₂ was used to quantify *stx*₂ GC in the phage DNA of the same samples (Imamovic *et al.*, 2010b). The primers and probe (900 nM for primer and 200 nM for the TaqMan probe) were used under standard conditions in a Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Spain). The *stx*₂ real-time qPCR assay has an efficiency of 94–100% and a detection limit of 5.29 *stx* copies (Imamovic *et al.*, 2010b).

Phage enumeration by double agar layer and plaque blot hybridization

A plate containing a lawn growth of a host strain was used to detect and count Stx phages by the double-agar-layer method, as described elsewhere (Muniesa *et al.*, 2004a). For this purpose, several host strains (*E. coli* WG5, DH5 α and C600, as well as *S. sonnei* isolate 866) were used in parallel. Briefly, the phage lysates obtained after induction were diluted tenfold. One hundred μ l of each dilution was then mixed with 100 μ l of 0.1 M CaCl₂ and 500 μ l of a log-phase culture (OD₆₀₀ = 0.3) of each host strain, and examined by the plaque assay using a double-agar-layer method. The plates were examined for the presence of plaques after incubation for 18 h at 37°C.

To determine the presence of the *stx*₁ gene and to count the Stx1 phages detected by the double agar layer, the plaques were transferred to a nylon membrane (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Spain) using a standard procedure (Sambrook and Russell, 2001). Hybridization was then performed as described elsewhere (García-Aljaro *et al.*, 2004). The membranes were hybridized at 65°C with a digoxigenin-labelled *stxA*₁ probe prepared by PCR with Stx1-up/Stx1-lp primers and labelled by incorporating digoxigenin-11-deoxy-uridine-triphosphate (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) during PCR (Muniesa *et al.*, 2004b). Stringent hybridization was achieved with the DIG-DNA Labeling and Detection kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) in line with the manufacturer's instructions. The concentration of plaque forming units (PFU ml⁻¹) was calculated for each lysate after hybridization using three plates of two different dilutions for each independent lysate. The values presented are the average of the three lysates assayed for each phage.

Electron microscopy studies

The Stx1 phage lysates obtained after mitomycin C treatment of the strains were further purified and concentrated in CsCl step gradients (Sambrook and Russell, 2001). To estimate the number of phage particles present in the lysates, 5 μ l of phage lysate was mixed 1:1 (v : v) with a stock of latex spheres of 100 nm diameter on average and of known concentration (1.82 \times 10¹⁰ spheres ml⁻¹; Proscitech, Queensland, Australia). The mixture was dripped into copper grids with carbon-coated Formvar films and negatively stained with 2% ammonium molybdate (pH 6.8) for 1.5 min. The samples were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope (JEOL Inc. Peabody, MA, USA) operating at 80 kV. The phage particles were counted and the number compared with that of latex spheres; the concentration of phage particles was then estimated from the ratio between the numbers

of the two classes of particle. Viral particle counts were derived from the following formula: [(total number of viral particles in a field)/(total number of latex spheres in a field)] \times (number of spheres from the stock). Three sets of grids were independently prepared with each phage lysate and five fields were evaluated for each grid. The numbers of phage particles presented correspond to the average of all the estimations for each phage.

Sequence analysis

Sequencing was performed with an ABI PRISM Big Dye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) in an ABI PRISM 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. BLAST analysis was performed with the tools available on the National Institutes of Health (NIH) webpage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Samples

A total of 357 samples (Table 3) were analysed. Of them, 56 raw sewage water samples collected during 2014 were obtained from the influent of a wastewater treatment plant that serves a large urban area, consisting of a number of cities and towns, with approximately 500,000 inhabitants. River samples (20) were collected twice a month during 2014 from the Llobregat river in the Barcelona area, which is subject to anthropogenic pressure (Colomer-Lluch *et al.*, 2011a). Wastewater samples from animals (29 from swine and 24 from poultry) were collected from several slaughterhouses and farms in Spain (Colomer-Lluch *et al.*, 2011b). Archive faecal samples (36) from cowpats in summer pastures were aseptically collected in the mountain area of the eastern Pyrenees mountains. Sludge samples (21) were collected from the digest of the same wastewater treatment plant described above. Sludge comprised a mixture of raw primary sludge (about two-thirds) and secondary sludge (about one-third) that was thickened and subjected to anaerobic mesophilic (35°C) digestion for 20–25 days. Samples of mixed soil (21) were collected from four different locations in Spain in areas used for agricultural purposes. Archived human stool samples (11) (Martínez-Castillo *et al.*, 2013) were also included in the study. Food samples were purchased from local retailers located in the city of Barcelona (Spain). The supermarkets and grocery stores were selected at random, and each sample was obtained from a different retailer to provide a more general overview. In most cases, the stores had different suppliers. Samples of ground beef (66) were freshly minced on request at local supermarkets. Commercially prepared salad mixtures (73) from different suppliers were also sampled and analysed. The salad mixtures presented some variations in salad composition, depending on the supermarket and the suppliers.

All the samples were collected in sterile containers, transported to the laboratory at 5°C \pm 2°C within 2 h of collection and processed immediately for bacterial counts and further experiments. The archived samples had been stored at -70°C for more than 1 year.

Isolation of free phages from the samples

Purification of phage particles from liquid (wastewater and river) environmental samples was performed as previously described (Imamovic *et al.*, 2010a) for 50 ml of sample. Solid samples (sludge, food or faeces) were firstly diluted 1/5 (w/v) in 1/4-strength Ringer's solution and homogenized as described for each sort of sample: food (Imamovic and Muniesa, 2011), sludge (Calero-Cáceres *et al.*, 2014) or faeces (Martinez-Castillo *et al.*, 2013). The resulting homogenates and the liquid samples were passed through low-protein-binding 0.22 µm-pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore). When necessary, several filter units were used to filter the whole volume. Partially purified bacteriophages were then 100-fold concentrated by protein concentrators (100 kDa Amicon Ultra-centrifugal filter units, Millipore), following the manufacturer's instructions, to reduce the volume to 0.5 ml. The bacteriophage concentrates were then treated with DNase (100 units ml⁻¹ of the phage lysate) to eliminate free DNA outside the phage particles. At this stage, an aliquot of the phage lysate was amplified by qPCR to confirm that free DNA containing *stx*₁ had been removed from the sample. The samples were then processed for phage DNA extraction as described above.

Statistics

Statistical tests were performed using the Statistical Package for Social Science software. ANOVA with a P value of 0.05 was applied to evaluate the significance of the differences presented by the different strains after induction.

Acknowledgments

The authors thank S. Morabito and the staff in EU *E. coli* reference laboratory (ISS, Rome) for providing some of the Stx1-producing strains. This study was supported by Spanish Ministerio de Innovación y Ciencia (AGL2012-30880), the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043) and the Centre de Referència en Biotecnologia (XeRBa). A. Martinez-Castillo and P. Quirós received grants from the Spanish Ministry.

References

Arnold, J.W., and Koudelka, G.B. (2014) The Trojan Horse of the microbiological arms race: phage-encoded toxins as a defence against eukaryotic predators. *Environ Microbiol* **16**: 454–466.

Beutin, L., Hammerl, J.A., Reetz, J., and Strauch, E. (2013) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from cattle as a source of the Stx2a bacteriophages present in enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 strains. *Int J Med Microbiol* **303**: 595–602.

Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., and Gyles, C.L. (1999) Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* **37**: 497–503.

Calderwood, S.B., and Mekalanos, J.J. (1987) Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus. *J Bacteriol* **169**: 4759–4764.

Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., and Muniesa, M. (2014) Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ Sci Technol* **48**: 7602–7611.

Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011a) Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE* **6**: e17549.

Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011b) Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 4908–4911.

Creuzburg, K., Köhler, B., Hempel, H., Schreier, P., Jacobs, E., and Schmidt, H. (2005a) Genetic structure and chromosomal integration site of the cryptic prophage CP-1639 encoding Shiga toxin 1. *Microbiology* **151**: 941–950.

Creuzburg, K., Recktenwald, J., Kuhle, V., Herold, S., Hensel, M., and Schmidt, H. (2005b) The Shiga toxin 1-converting bacteriophage BP-4795 encodes an NleA-like type III effector protein. *J Bacteriol* **187**: 8494–8498.

Crocker, T.T., and Bennett, B.M. (1952) Electron microscopic counting of elementary bodies of the virus of meningopneumonitis. *J Immunol* **69**: 183–196.

De Grandis, S., Ginsberg, J., Toone, M., Climie, S., Friesen, J., and Brunton, J. (1987) Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. *J Bacteriol* **169**: 4313–4319.

Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Jacobs, E., and 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.

Fong, T.-T., and Lipp, E.K. (2005) Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 357–371.

Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O'Brien, A.D., and James, M.N.G. (2004) Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **279**: 27511–27517.

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.

Fries, J.S., Characklis, G.W., and Noble, R.T. (2008) Sediment-water exchange of *Vibrio* sp. and fecal indicator bacteria: implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water Res* **42**: 941–950.

García-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J., and Blanch, A.R. (2004) Prevalence of the *stx*₂ gene in coliform populations from aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3535–3540.

Grabow, W.O., and Coubrough, P. (1986) Practical direct plaque assay for coliphages in 100-ml samples of drinking water. *Appl Environ Microbiol* **52**: 430–433.

- Griffin, P.M., and Tauxe, R.V. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* **13**: 60–98.
- Gyles, C.L. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* **85**: E45–E62.
- Imamovic, L., and Muniesa, M. (2011) Quantification and evaluation of infectivity of shiga toxin-encoding bacteriophages in beef and salad. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3536–3540.
- Imamovic, L., and Muniesa, M. (2012) Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS ONE* **7**: e32393.
- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., and Muniesa, M. (2009) Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1764–1768.
- Imamovic, L., Ballesté, E., Jofre, J., and Muniesa, M. (2010a) Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5693–5701.
- Imamovic, L., Serra-Moreno, R., Jofre, J., and Muniesa, M. (2010b) Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. *J Appl Microbiol* **108**: 1105–1114.
- James, C.E., Stanley, K.N., Allison, H.E., Flint, H.J., Stewart, C.S., Sharp, R.J., *et al.* (2001) Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4335–4337.
- McGannon, C.M., Fuller, C.A., and Weiss, A.A. (2010) Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 3790–3798.
- Martínez-Castillo, A., Allué-Guardia, A., Dahbi, G., Blanco, J., Creuzburg, K., Schmidt, H., and Muniesa, M. (2012) Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater. *Environ Microbiol Rep* **4**: 147–155.
- Martínez-Castillo, A., Quirós, P., Navarro, F., Miró, E., and Muniesa, M. (2013) Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl Environ Microbiol* **79**: 4862–4868.
- Muniesa, M., and 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.
- Muniesa, M., and Schmidt, H. (2014) Shiga toxin-encoding phages: multifunctional gene ferries. In *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology*. Morabito, S. (ed.). Linton: Horizon Press, pp. 57–77.
- Muniesa, M., Blanco, J.E., De Simón, M., Serra-Moreno, R., Blanch, A.R., and Jofre, J. (2004a) Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* **150**: 2959–2971.
- Muniesa, M., Serra-Moreno, R., and Jofre, J. (2004b) Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the stx genes appeared conserved. *Environ Microbiol* **6**: 716–725.
- Murinda, S.E., Nguyen, L.T., Landers, T.L., Draughon, F.A., Mathew, A.G., Hogan, J.S., *et al.* (2004) Comparison of *Escherichia coli* isolates from humans, food, and farm and companion animals for presence of Shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers. *Foodborne Pathog Dis* **1**: 178–184.
- Mühlendorfer, I., Hacker, J., Keusch, G.T., Acheson, D.W., Tschäpe, H., Kane, A.V., *et al.* (1996) Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **64**: 495–502.
- Nassar, F.J., Rahal, E.A., Sabra, A., and Matar, G.M. (2013) Effects of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin release and role of the SOS response. *Foodborne Pathog Dis* **10**: 805–812.
- Neely, M.N., and 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**: 1255–1267.
- Parreira, V.R., and Gyles, C.L. (2002) Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **87**: 341–352.
- Plunkett, G., Rose, D.J., Durfee, T.J., and 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**: 1767–1778.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., *et al.* (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**: 681–685.
- Ritchie, J.M., Wagner, P.L., Acheson, D.W.K., and Waldor, M.K. (2003) Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1059–1066.
- Rooks, D.J., Yan, Y., McDonald, J.E., Woodward, M.J., McCarthy, A.J., and Allison, H.E. (2010) Development and validation of a qPCR-based method for quantifying Shiga toxin-encoding and other lambdoid bacteriophages. *Environ Microbiol* **12**: 1194–1204.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY 999.
- Sato, T., Shimizu, T., Watarai, M., Kobayashi, M., Kano, S., Hamabata, T., *et al.* (2003) Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages. *J Bacteriol* **185**: 3966–3971.
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., *et al.* (2012) Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* **50**: 2951–2963.
- Sekse, C., Muniesa, M., and Wasteson, Y. (2008) Conserved Stx2 phages from *Escherichia coli* O103:H25 isolated from patients suffering from hemolytic uremic syndrome. *Foodborne Pathog Dis* **5**: 801–810.
- Shimizu, T., Kawakami, S., Sato, T., Sasaki, T., Higashide, M., Hamabata, T., *et al.* (2007) The serine 31 residue of the B subunit of Shiga toxin 2 is essential for secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **75**: 2189–2200.

- Shimizu, T., Ohta, Y., and Noda, M. (2009) Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect Immun* **77**: 2813–2823.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F., and Osborn, A.M. (2006) Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ Microbiol* **8**: 804–815.
- Sobsey, M., Battigelli, D., Shin, G., and Newland, S. (1998) RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water Sci Technol* **38**: 91–94.
- Steinberg, K.M., and Levin, B.R. (2007) Grazing protozoa and the evolution of the *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding prophage. *Proc Biol Sci* **274**: 1921–1929.
- Steyert, S.R., Sahl, J.W., Fraser, C.M., Teel, L.D., Scheutz, F., and Rasko, D.A. (2012) Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 133.
- Strauch, E., Hammerl, J.A., Konietzny, A., Schneiker-Bekel, S., Arnold, W., Goesmann, A., *et al.* (2008) Bacteriophage 2851 is a prototype phage for dissemination of the Shiga toxin variant gene 2c in *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **76**: 5466–5477.
- Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D. (1988) Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* **170**: 1116–1122.
- Tanji, Y., Mizoguchi, K., Yoichi, M., Morita, M., Kijima, N., Kator, H., and Unno, H. (2003) Seasonal change and fate of coliphages infected to *Escherichia coli* O157:H7 in a wastewater treatment plant. *Water Res* **37**: 1136–1142.
- Tarr, P.I., Gordon, C.A., and Chandler, W.L. (2005) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **365**: 1073–1086.
- Tyler, J.S., Mills, M.J., and 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**: 7670–7679.
- Virus Taxonomy (2011). Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Wagner, P.L., and Waldor, M.K. (2002) Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun* **70**: 3985–3993.
- Wagner, P.L., Livny, J., Neely, M.N., Acheson, D.W.K., Friedman, D.I., and Waldor, M.K. (2002) Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 957–970.
- Wells, J.G., Davis, B.R., Wachsmuth, I.K., Riley, L.W., Remis, R.S., Sokolow, R., and Morris, G.K. (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* **18**: 512–520.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., *et al.* (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469–3478.
- Yan, Y., Shi, Y., Cao, D., Meng, X., Xia, L., and 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**: 458–464.
- Zhang, Y., Laing, C., Steele, M., Ziebell, K., Johnson, R., Benson, A.K., *et al.* (2007) Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages. *BMC Genomics* **8**: 121.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Table S1. List of sequences for each *stx*₁ subtype available in GenBank and used to design the *stx*₁ specific qPCR assay.

Table S2. Raw data of each sample showing positive detection of Stx1 phages.

4.3. CAPÍTULO 3:

Contribución de los vegetales y la tierra de cultivo en la propagación de fagos Stx y la emergencia de nuevas cepas productoras de toxina Shiga.

CONTRIBUCIÓN DE LOS VEGETALES Y LA TIERRA DE CULTIVO EN LA PROPAGACIÓN DE FAGOS STX Y LA EMERGENCIA DE NUEVAS CEPAS PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA.

Pablo Quirós y Maite Muniesa.

Scientific Reports. 2017 Aug 10; 7(1):7796.

Introduction

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de la toxina Shiga (STEC) son patógenos transmitidos por los alimentos en todo el mundo (Reilly, 1998) y asociados con enfermedades tales como diarreas, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (HUS) o la púrpura trombótica trombocitopénica (TTP) (Monaghan et al., 2012). El principal factor de virulencia es la toxina Shiga. Existen dos tipos, Stx1 (subtipos a, c, d y e) y Stx2 (subtipos a, b, c, d, e, f y g) (Scheutz et al., 2012; Khalil et al., 2016).

Los genes que codifican para Stx en *E. coli* están localizados en el genoma de bacteriófagos atemperados e inducibles (fagos Stx) (Herold et al., 2004). Estos genes se sobreexpresan cuando se induce el ciclo lítico del fago (Johannes and Römer, 2010) causado por algún agente estresante para la bacteria, tales como antibióticos, químicos, radiación ultravioleta, etc (Oppenheim et al., 2005; Feiner et al., 2015). La lisis bacteriana causada lleva a la diseminación, propagación y excreción de estos fagos a través de las heces (Martinez-Castillo et al., 2013).

Los últimos años han sido testigos de una tendencia mundial hacia el consumo de una dieta saludable rica en frutas, verduras y productos vegetales frescos y crudos. Sin embargo estos alimentos se producen en ambientes donde existe un alto riesgo de contaminación (Berger et al., 2010). El suelo, el abono y el agua de riego son importantes fuentes de contaminación de vegetales (Semenov and Franz, 2008; Tyler and Triplett, 2008). En los últimos diez años se han incrementado cada vez más las enfermedades de origen alimentario en frutas y hortalizas (Heaton and Jones, 2008; Whipps et al., 2008; Teplitski et al., 2009; Marder et al., 2014).

Los fagos Stx libres son más persistentes que las bacterias (Allué-Guardia et al., 2014) y están involucrados en la transducción horizontal de *stx* (Tóth et al., 2003; Imamovic et al., 2009). Su persistencia y probabilidad de transducción aumentan el riesgo de que nuevas cepas STEC emerjan en el ambiente y los alimentos, particularmente cuando los alimentos se consumen crudos o parcialmente cocinados.

Objetivos

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de fagos Stx en vegetales y tierra de cultivo, evaluar su persistencia y la capacidad de estos fagos Stx para transducir el gen *stx*, usando diferentes tipos de vegetales comunes en ensaladas y tierras de cultivo como matrices.

Resultados

Detección de fagos Stx1 y Stx2 en vegetales y tierra de cultivo

Los fagos Stx fueron cuantificados por qPCR en muestras de lechuga, pepino, espinacas y tierra de cultivo (16 de cada tipo). Los fagos Stx1 solo fueron encontrados directamente en una muestra de pepino, mientras que los fagos Stx2 estuvieron presentes en tierra, lechuga y pepino (Tabla 1). Los fagos Stx2 fueron muy abundantes en las muestras de tierra.

Propagación de los fagos Stx en las muestras

Para evaluar la infectividad de los fagos Stx presentes en las muestras, las partículas fágicas purificadas de diez muestras de cada matriz (lechuga, pepino, espinaca y tierra) fueron usadas para infectar un cultivo de *E. coli* WG5 (negativo para *stx*), anteriormente descrita como un huésped de amplio rango para fagos Stx1 y Stx2 (Muniesa et al., 2004). Esta propagación muestra la infectividad de las partículas de fago Stx, y permite la detección de fagos Stx después de la propagación en muestras que eran negativas cuando analizamos directamente. Se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) en las densidades de fagos Stx después de su propagación en muchas de las muestras, en particular para los fagos Stx2. El incremento osciló entre menos de 1 unidades \log_{10} hasta 4-5 \log_{10} CG (Fig. 1).

Persistencia de los fagos Stx2 en las muestras

El fago 933W, considerado un modelo para el estudio de fagos Stx2, se utilizó para evaluar la persistencia de los fagos Stx en las muestras de vegetales y suelo. Simultáneamente, se evaluó la persistencia de una *E. coli* C600 lisogénica para un fago recombinante 933W, en el que los genes *stx* fueron reemplazados por genes *gfp-cat* (Figura S1). Esta modificación permitió cuantificar las células bacterianas (mediante qPCR de *gfp*), y los fagos Stx (mediante qPCR de *stx2*) en las mismas muestras y en las mismas condiciones, (Tabla 2). También se monitorizaron las células bacterianas viables cultivadas en placas de agar LB + cm y los fagos Stx infecciosos con la capacidad de infectar *E. coli* WG5 por hibridación en membrana de las calvas de lisis generadas.

Se observaron tendencias similares en cuanto a la persistencia en el suelo, pepino, lechuga o espinaca entre 4°C (Fig. 2) y 23°C (Fig. 3), ambas temperaturas comunes de almacenamiento de hortalizas.

En cuanto a los análisis por qPCR, las bacterias presentaron una disminución de menos de 1 \log_{10} en ambas temperaturas durante los 10 días. Los fagos mostraron una reducción acorde con la reducción en infectividad (Fig. 2 y 3) durante los 10 días.

La reducción en cuanto a bacterias cultivables fue menor a 1 \log_{10} en todas las matrices y a ambas temperaturas. Esto podría deberse a un cierto crecimiento bacteriano durante los días que dura el experimento. Este efecto fue mucho más marcado a 23°C. El número de fagos Stx infecciosos (y en menor medida, sus valores de qPCR equivalentes) se redujo durante el almacenamiento a 4°C o 23°C, con una reducción ligeramente mayor a 23°C (Fig. 3). Una comparación entre el número de fagos Stx infecciosos y qPCR revelaron grandes diferencias con la cuantificación molecular. La

reducción en fagos Stx infecciosos fue más marcada en muestras de suelo y las menores reducciones se observaron en espinacas a 4°C (sólo 0,5 logs).

Adicionalmente se realizó un germinado de lentejas para usar brotes vegetales como matriz de nuevos experimentos. Se usaron lentejas y un germinador en el laboratorio, y en cuanto éstas germinaron, se realizaron los mismos ensayos de persistencia a ambas temperaturas y para ambos microorganismos en los brotes (Figura 4). La reducción en los valores de qPCR para ambos microorganismos estaba siempre por debajo de 1 log₁₀. En contraste, las bacterias cultivables (y los valores de qPCR) aumentaron a 23°C. La reducción de fagos Stx infecciosos fue más marcada a 4°C mientras que no se observó reducción a 23°C.

Transducción de fagos Stx en vegetales y tierra de cultivo

La bacteria *Shigella sonnei* cepa 866 (negativa para *stx*) fue usada para evaluar la transducción de los fagos Stx en todas las matrices (lechuga, pepino, espinacas, tierra y brotes de lenteja). Esta bacteria presenta de forma natural resistencia a tetraciclina (Tc). La transducción fue llevada a cabo usando un fago 933W en el que el gen *stx* fue remplazado por un gen de resistencia a kanamicina (*Kn*) (933W Δ *stx*₂::*Kn*), inhibiendo el crecimiento de flora acompañante de la matriz al suplementar con Km y Tc el LB agar donde fueron sembradas.

Tras 12h a 23°C, aparecieron transductantes en todas las matrices, un elevado número fue observado en pepino, seguido de espinaca y en menor medida en tierra, lechuga y brotes de lenteja.

Discusión

El consumo de productos frescos está aumentando, debido principalmente a una mayor conciencia de los beneficios de comer estos productos y a las campañas de educación sanitaria para promover el consumo de verduras (Harris *et al.*, 2003). Esto ha llevado a aumentar la demanda de frutas y hortalizas poco tratadas, listas para el consumo, así como productos fuera de temporada y exóticos (Everis, 2004).

Sin embargo, el aumento de enfermedades transmitidas por bacterias y virus en los últimos años se ha asociado con esta tendencia emergente de "comida sana".

Algunos patógenos bacterianos se encuentran en los tejidos internos de las plantas, y por lo tanto no pueden ser lavados o matados por desinfectantes. *E. coli* O157:H7 o *S. enterica* tienen la capacidad de colonizar tanto el exterior como el interior de las plántulas de lechuga y tomate cultivadas en suelo fertilizado con estiércol contaminado (Solomon *et al.*, 2002, Bernstein *et al.*, 2007, Franz and van Bruggen, 2008, Tyler and Triplett, 2008).

La supervivencia de patógenos bacterianos en las superficies vegetales y en el suelo es crítica, ya que es la vía de transmisión a los seres humanos. En el caso particular de STEC, es necesaria una evaluación adicional de los fagos Stx, puesto que son los principales responsables de la transferencia de *stx* y la aparición de nuevas cepas STEC virulentas. De particular importancia es la presencia, persistencia y capacidad de transducción de los fagos Stx en muestras de suelo. El estiércol, las

aguas residuales y lodos tratados se aplican rutinariamente a los campos de cultivo como un fertilizante (Bradford *et al.*, 2013).

Si bien las regulaciones actuales tienen en cuenta los riesgos de patógenos bacterianos y virales, se presta poca atención a la presencia de fagos, lo que compromete la seguridad de los productos frescos.

Los resultados muestran que tanto las bacterias como los fagos permanecieron cultivables o infecciosos en las muestras después de al menos 10 días de almacenamiento usando dos temperaturas comunes de almacenamiento. La supervivencia de las bacterias STEC patógenas, incluido el serotipo O157, se ha demostrado previamente en cultivos de hojas verdes (Tomás-Callejas *et al.*, 2011; Macarisin *et al.*, 2013; Delbeke *et al.*, 2015) y en tierra de cultivo (Semenov and Franz, 2008; Ma *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2015).

La mínima reducción bacteriana observada a 23°C pudo haber sido debida al crecimiento de las células bacterianas durante el período que duró el experimento, pero si esto es cierto, se supone que las bacterias podrían permanecer metabólicamente activas, por lo que son aún más susceptibles a la conversión por fagos Stx.

La primera observación es que los fagos Stx estaban presentes en todos los tipos de vegetales y suelos. La presencia habitual de los fagos Stx libres, en particular los fagos Stx2, en diferentes ambientes ha sido descrita previamente (Muniesa and Jofre, 1998; Imamovic *et al.*, 2010; Imamovic and Muniesa, 2011). La segunda observación es que los fagos Stx que están presentes naturalmente en estas muestras tienen la capacidad de propagarse dentro de las matrices. El alto aumento en el número de CG observado en muchas de las muestras apunta hacia la capacidad de los fagos Stx para producir nuevas partículas después de infectar *E. coli* WG5. La susceptibilidad a la infección es el primer paso para la conversión de *stx* si el fago entra en contacto con el huésped adecuado. Esto es importante porque la detección de fagos Stx no infectivos o incluso defectuosos serían incapaces de transferir el gen (Quirós *et al.*, 2016), lo que anula el riesgo de transducción de *stx*, y por lo tanto de la generación de nuevas STEC.

Además, como se demuestra en nuestro modelo, no hubo restricción en la transducción en ninguna de las matrices analizadas generándose nuevas STEC. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos realizados en muestras de suelo (Nyambe *et al.*, 2016), ensaladas (Imamovic *et al.*, 2009) y biofilms (Urdahl *et al.*, 2013).

Dado que tres de las matrices analizadas se consumen crudas (lechuga, brotes y pepino), e incluso las espinacas pueden ser incluidas crudas en ensaladas, el bajo número de transductantes generados sería suficiente para plantear un riesgo para la salud.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Contribution of cropland to the spread of Shiga toxin phages and the emergence of new Shiga toxin-producing strains

Pablo Quirós & Maite Muniesa 

A growing interest in healthy eating has led to an increase in the consumption of vegetables, associated with a rising number of bacterial outbreaks related to fresh produce. This is the case of the outbreak in Germany, caused by a O104:H4 enteroaggregative *E. coli* strain lysogenic for a Stx phage. Temperate Stx phages released from their hosts occur as free particles in various environments. This study reports the occurrence of Stx phages in vegetables (lettuce, cucumber, and spinach) and cropland soil samples. Infectious Stx2 phages were found in all samples and many carried also Stx1 phages. Their persistence in vegetables, including germinated sprouts, of Stx phage 933W and an *E. coli* C600 (933W Δ stx::gfp-cat) lysogen used as surrogate, showed reductions below 2 log₁₀ units of both microorganisms at 23 °C and 4 °C over 10 days. Higher reductions (up to 3.9 log₁₀) units were observed in cropland soils at both temperatures. Transduction of a recombinant 933W Δ stx::kan phage was observed in all matrices. Protecting against microbial contamination of vegetables is imperative to ensure a safe food chain. Since the emergence of new Stx strains by Stx phage transduction is possible in vegetable matrices, methods aimed at reducing microbial risks in vegetables should not neglect phages.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are foodborne pathogens associated world wide¹ with human diseases such as diarrhea, hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome (HUS), and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)². The principal virulence factor of STEC is the Shiga toxin. There are two Stx types, Stx1 with 4 subtypes (a, c, d, and e) and Stx2 with 7 subtypes (a to g)^{3,4}. In humans, Stx2 is the most dangerous type and is often associated with HUS⁵. In mouse assays, Stx2 was 400 times more virulent than Stx1⁶.

The genes encoding Stx in *E. coli* are located in the genomes of inducible temperate bacteriophages (Stx phages)⁷. stx genes are overexpressed when the lytic cycle of the phage is induced⁸. A bacterial SOS system is activated when bacteria detect environmental stressors such as antibiotics, chemicals, ultraviolet light, or salts, triggering the switch from a lysogenic to a lytic cycle^{9,10}. In addition, the bacterial lysis caused by Stx phages leads to the dissemination, propagation, and excretion of these phages through feces¹¹.

Domestic ruminants comprise the main reservoir of STEC^{12,13}. The ingestion of contaminated food or water and direct contact with rural environments are the most common routes of transmission to humans. Recent years have witnessed a global trend toward eating a healthy diet rich in fruits, vegetables, and fresh, raw vegetable products. However, these vegetables may have been grown in soil in open fields, entailing a risk of contamination by toxins or pathogens¹⁴. Moreover, soil, manure, and irrigation water are important sources of plant contamination^{15,16}. At all these stages, the interactions between vegetables and enteric pathogens may be more complex than previously thought.

There have been numerous Stx-producing *E. coli* outbreaks linked to vegetable consumption. One of the most notable was the widespread outbreak in Japan associated with sprouts in 1996¹⁷. A growing number of foodborne illnesses have been increasingly traced back to fruits and vegetables in the last ten years^{18–21}, arousing concern that plants might be an important vehicle for human enteric pathogens.

In 2011, there was a major outbreak in the European Union (Germany and France) of STEC O104:H4 traced to sprouted fenugreek seeds produced in Egypt, in which 3,816 people were infected, 845 developed HUS and 54 died^{22,23}.

Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, E-08028, Barcelona, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.M. (email: mmuniesa@ub.edu)

	Soil	Lettuce	Cucumber	Spinach
n	16	15	15	15
Stx1 phages*	0	0	5.6×10^4	0
n° of positives samples	0	0	1	0
Stx2 phages*	9.5×10^3 (9.7×10^3)	6.8×10^3	3.8×10^4 (1.1×10^4)	0
n° of positives samples	8	1	2	0

Table 1. Occurrence of Stx1 and Stx2 phages (GC.g⁻¹) in vegetable and soil samples. *Average value of the positive samples. In brackets SD.

The causative agent of this outbreak was an enteroaggregative *E. coli* strain of serotype O104:H4 with the capacity to produce Shiga toxin through the transduction of *stx*_{2a} via a temperate Stx phage^{24,25}. The origin of this Stx phage and the circumstances leading to the transduction event are unknown.

Free Stx phages are more persistent than bacteria²⁶ and are involved in the horizontal transduction of *stx*^{27,28}. Their persistence and likelihood of transduction increase the risk of new STEC strains emerging in the environment and in food, particularly when food is consumed raw or only partially cooked. The aim of this study was to evaluate the occurrence, persistence, and capacity of Stx phages to transduce *stx* and generate Stx-lysogens using different types of salad vegetable and cropland soil as matrices.

Results

Detection of Stx1 and Stx2 phages in vegetable and soil matrices. Stx phages were quantified by qPCR in lettuce, cucumber, spinach, and soil samples and positive samples were considered when the qPCR threshold cycle (Ct) was below 32 (quantification limit of 38.7 GC/well). Some samples showed negative amplification (undetermined), while some showed amplification signal but with Ct values above 32, and were considered negatives. Stx1 phages were rarely present in the samples analyzed, and were only detected in one cucumber sample. In contrast, Stx2 phages were present in soil, lettuce, and cucumber (Table 1), and only in spinach did values fall below the quantification limit. When detected, the densities (GC.g⁻¹) of the Stx phages were not negligible, being in average above 10³ GC.g⁻¹ in all positive samples (Table 1).

Propagation of Stx phages in the samples. To evaluate the infectivity of Stx phages naturally occurring in the samples, phage particles purified from ten samples (from A to J) of each matrix, each from a different location, were used to infect a culture containing *E. coli* WG5 strain, previously reported as being sensitive to a wide range of Stx1 and Stx2 phages²⁹. This approach offers two advantages for Stx phage detection: it generates information about the infectivity of the Stx phage particles, because of their capacity to propagate and, as shown in Fig. 1, it enables detection of Stx phages after propagation in samples that were otherwise negative if directly analyzed. We observed a significant ($P < 0.05$) increase (in log₁₀ GC units) in the densities of Stx phages after their propagation in many of the samples (Fig. 1), particularly for Stx2 phages and in a lesser extent for Stx1 phages. The increase ranged from less than 1 log₁₀ units to up to 4–5 log₁₀ GC (Fig. 1).

Persistence of Stx2 phages in the samples. Phage 933W, considered a model for the study of Stx phages, was used to evaluate persistence in the vegetable and soil samples. Simultaneously, and to avoid bias caused by different samples, we evaluated the persistence of *E. coli* C600 strain lysogenic for a recombinant phage 933W, in which the *stx* genes were replaced by *gfp-cat* genes (Fig. S1). This modification made it possible to quantify bacterial cells (by *gfp* absolute qPCR quantification) and Stx phages (by *stx*₂ absolute qPCR quantification) in the same samples and under the same conditions, using the two qPCR assays (Table 2). Viable bacterial cells grown in LB agar plates + cm and infectious Stx phages with the capacity to infect *E. coli* WG5 enumerated by plaque blot were also monitored.

Similar trends in persistence in soil, cucumber, lettuce, or spinach were observed at 4 °C (Fig. 2) and 23 °C (Fig. 3), both assayed as being common storage temperatures for vegetables.

When bacteria were analyzed by qPCR, reductions in the number of GC were not significant ($P > 0.05$) and lower than 1 log₁₀ unit under all conditions. In contrast, the qPCR assay for phages in cucumber and soil at 23 °C showed moderate but significant ($P < 0.05$) reductions of more than 1 log₁₀ unit, in accordance with the reductions shown by infectious phages (Figs 2 and 3) over the 10 days that the experiments lasted. The results were repeated in the three replicates performed independently.

The reduction in culturable bacteria under all conditions and in all matrices was very low (less than 1 log₁₀ unit) and no significant ($P > 0.05$). In this situation, bacterial counts could also be influenced by cell regrowth during storage. This was particularly marked at 23 °C, a temperature at which the curves showed a significant ($P < 0.05$) increase (black dots), initiated in the first 24 hours and probably maintained during the 10 day period, compensating for cell death (Fig. 3). This growth was not observed at 4 °C (Fig. 2) but also there was not a significant ($P < 0.05$) reduction in viable bacteria. In contrast, the number of infectious Stx phages (and to a lesser extent, their counterpart qPCR values as indicated above) significantly ($P < 0.05$) dropped off during storage at either 4 °C or 23 °C (Figs 2 and 3). A comparison between the number of infectious Stx phages and qPCR values revealed large differences with the molecular quantification. The reduction in infectious Stx phages was most marked in soil samples and the lowest reductions were observed in spinach at 4 °C (only 0.5 logs).

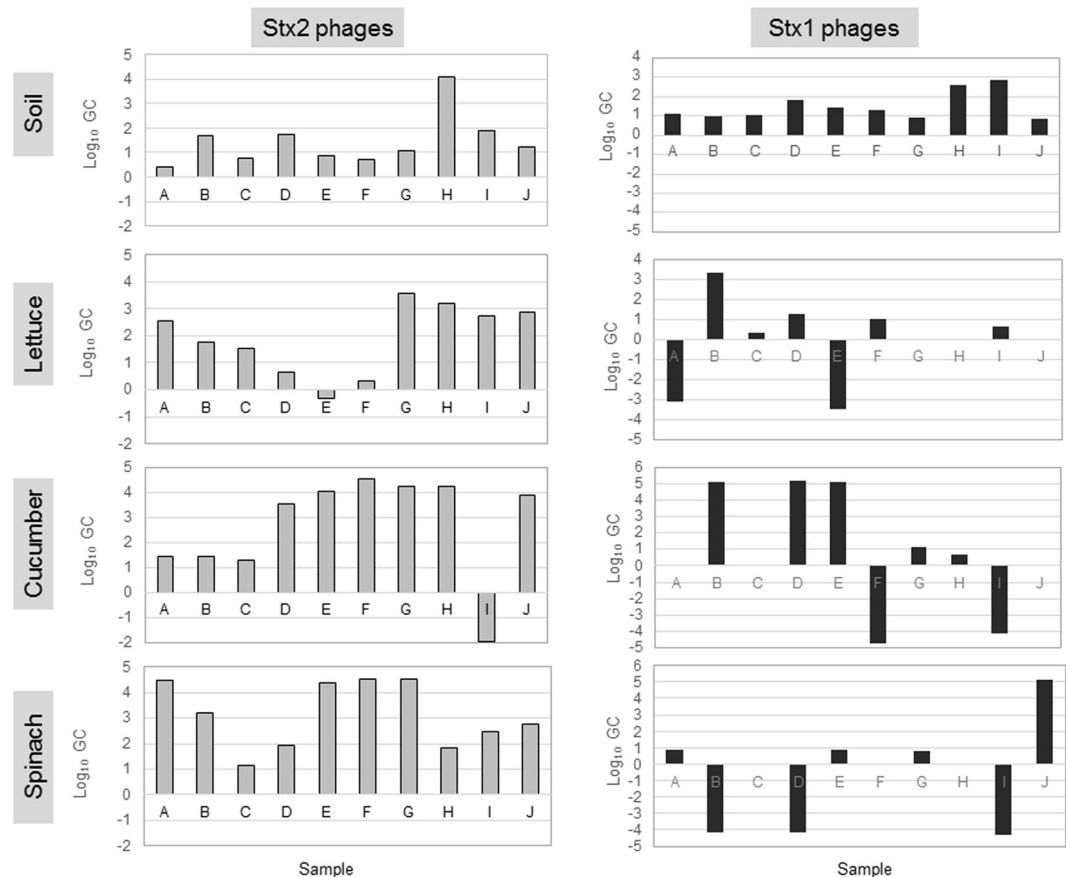


Figure 1. Difference in log₁₀ GC units of Stx1 and Stx2 phages extracted from matrices after propagation in *E. coli* WG5 strain. A positive difference indicates phages were infective and able to propagate.

We sprouted lentil seeds in laboratory conditions using sterile water to perform a similar series of persistence experiments at both temperatures and for both microorganisms (Fig. 4). When cultivated in sprouts, only a significant ($P < 0.05$) reduction of infectious Stx phages was observed at 23 °C. However, this result was not in correspondence with qPCR values, that did not decrease. This lack of correspondence between infectious Stx phages and qPCR evaluation was also observed in lettuce, but not in the other matrices. Bacteria (culturable and qPCR) showed a moderate (0.4 and 0.7 log units) but still significant ($P < 0.05$) increase at 23 °C, attributed as explained above, to the growth of the strain (Fig. 4).

Long-term storage of Stx phages was additionally assayed with ten soil samples stored at 4 °C for six months. After storage, the ten samples were negative for Stx1 phages and 6/10 were positive for Stx2 phages (average values of 1.5×10^4 GC.g⁻¹ (SD of 8.6×10^3)). Phages were propagated in *E. coli* WG5 and after propagation 3/10 samples showed Stx1 phages (average values of 2.6×10^5 GC.g⁻¹ (SD of 2.1×10^5)). 10/10 samples showed Stx2 phages (average values of 1.3×10^5 GC.g⁻¹ (SD of 1.2×10^5)). However, evaluation of infectious phage particles in these samples was not possible because no plaques of lysis were detected by plaque blot hybridization.

Transduction of Stx phages in vegetable and soil matrices. Infectious Stx phages have the potential capacity to infect a suitable bacterial host and convert it into a Stx producer. The *S. sonnei* strain 866 was used to evaluate the transduction of Stx phages within the matrices. This host has previously been reported to be a very efficient host for Stx phage transduction, and also shows natural resistance to tetracycline (Tc). Transduction was successfully achieved using a recombinant phage 933W in which *stx* was replaced by the kanamycin (Km) resistance gene (933W Δ *stx*₂::*kan*) (Fig. S1), enabling selection of transductants and reducing the interference of background flora present in the samples by inhibiting its growth in the LB agar plates supplemented with Km and Tc (see materials and methods).

Transductant colonies were generated in all matrices assayed, with a significant ($P < 0.05$) higher number of transductants observed in cucumber (Fig. 5), followed by spinach, and in lower amounts in soil, lettuce, and lentil sprouts. The control performed in LB showed no significant ($P > 0.05$) differences with the spinach matrices and deviations comparable to those observed in the samples. These deviations between replicates were attributable to the different efficiencies in generation and growth of the transductants, in variations in the rate of induction of the phage in each replicate or the different moment during the incubation of the culture in which transductants were generated. Nevertheless, the number of transductants counted in the agar plates was the result of 12 h incubation in the matrices at 23 °C. The number of transductants obtained allow to observe differences between matrices, but

Name	Sequence (5'-3')	Target	Reference
S2Aup	ATGAAGTGATATTATTTA	<i>stx</i> _{2A} fragment	66
S2Alp	TTCTTCATGCTTAACCTCT		
<i>gfp</i> short-up	TCCATCTTCAATGTTGTGTCT	<i>gfp</i> fragment	67
<i>gfp</i> short-lp	GAACATAAGACACGTGCTGA	<i>gfp</i> fragment	
km-5	GTCAGCGTAATGCTCTGC	fragment of <i>kan</i> in pOX38	This study
km-3	GTCTGCTTACATAAACAG		This study
km5-stx	<u>GCGTTTTGACCATCTTCGTCIGATTATTGAGCAAATAATTATATGTGGCCGGGTCAGCGTAATGCTCTGC</u>	Amplifying <i>kan</i> . Underlined homology with <i>stx</i> _{2A} overlapping <i>stx</i> _{2A}	This study
km3-stx	<u>ACAGGAGCAGTTTCAGACAGTGCCTGACGAAATCTCTCTGTATCTGCCTGAAGTCTGCTTACATAAACAG</u>	Amplifying <i>kan</i> . Underlined homology with <i>stx</i> _{2A}	This study
rho	TCATCGGGACAGAGCGCCA	upstream <i>stx</i> ₂ -A	68, 69
RR46 LP	GAGCTCTAAGGAGTTAT	red recombinase in pKD46	61
RR46-UP	GTGCAGTACTCATTGCTT		
GFPTir-F	GCTTCCATCTTCAATGTTGTGTCT	real-Time qPCR for <i>gfp</i>	67
GFPTir-R	CATTCTTGACACAAATTGGAATACAACCT		
GFPTir-probe	FAM-CATGGCAGACAAACAA-NFQ		
<i>stx</i> ₁ up qPCR	GCGGTTACATTGTCTGGTGACA	real-Time qPCR for <i>stx</i> ₁	49
<i>stx</i> ₁ lp qPCR	GCATCCCCGTACGACTGATC		
<i>stx</i> ₁ -probe	FAM-TAGCTATACCAGTTACAGCG-NFQ		69
STX-Any f	ACGGACAGCAGTTATACCACTCT	real-Time qPCR for <i>stx</i> ₂	
STX-Any r	CTGATTTGCATTCCGGAACGT		
STX-Any probe	FAM-CCAGCGCTGCGACAG-NFQ		

Table 2. Oligonucleotides used in this study.

because they were produced after an incubation period, the qualitative rather than the quantitative result should be considered.

At least 20% of the km-resistant transductants generated with the colony morphology of *Shigella* were confirmed by PCR amplification using rho-km3 as primers (Table 2). All colonies tested positive and were confirmed as transductants, indicating that the interference of background flora in the matrices was negligible. Controls performed with *S. sonnei* strain 866 without the 933W-km phage did not show colonies in the presence of Km-Tc, confirming the lack of false positive colonies.

Discussion

Consumption of fresh produce is rising, mainly due to heightened awareness of the benefits of eating such products and the health education campaigns that several governments have carried out promoting the consumption of fruit and vegetables³⁰. This has led to consumer demand for increased choice, including minimally processed, pre-packed, ready-to-eat fruit and vegetables, out-of-season produce, and exotic products³¹. However, an increase in bacterial and viral foodborne disease outbreaks in recent years has been associated with this emerging trend for “healthy eating”. There are good reasons for concern, since many vegetables are eaten raw or only lightly cooked, without a significant pathogen-reducing effect. Moreover, the number of disease cases per outbreak seems to be higher in the case of vegetables than for any other products involved in pathogen transmission³².

Soil, manure, and irrigation water could be sources of bacterial pathogens reaching the roots, the leaves, or the fruits. Some bacterial pathogens are found in internal plant tissues, and thus cannot be washed off or killed by disinfectants. *E. coli* O157:H7 or *S. enterica* have the capacity to colonize the exterior as well as the interior of lettuce and tomato seedlings grown in soil amended with contaminated manure^{16, 32–34}. It should be noted that most published studies have been conducted under laboratory growing conditions or inside chambers that could have favored the entry of bacteria into plant tissue. In contrast, an outdoor environment should favor the development of thicker tissues and cuticles that could act as barriers to bacterial penetration. However, indoor cultivation in greenhouses is a common activity in vegetable production and is the only way to produce sprouts, leading to intervention with different treatments to eliminate pathogens³⁵.

Even without internalization, the survival of bacterial pathogens on vegetable surfaces and in soil is critical because this is the route of transmission to humans. In the particular case of STEC, additional evaluation of Stx phages—the main drivers behind *stx* transference and the emergence of new virulent STEC strains—is necessary because their capacity to infect and convert new bacterial strains depends on this persistence.

Of particular importance is the occurrence, persistence, and transduction capacity of Stx phages in soil samples. Manure, treated wastewater, and sludge are routinely applied to crop fields as a soil amendment³⁶. If the

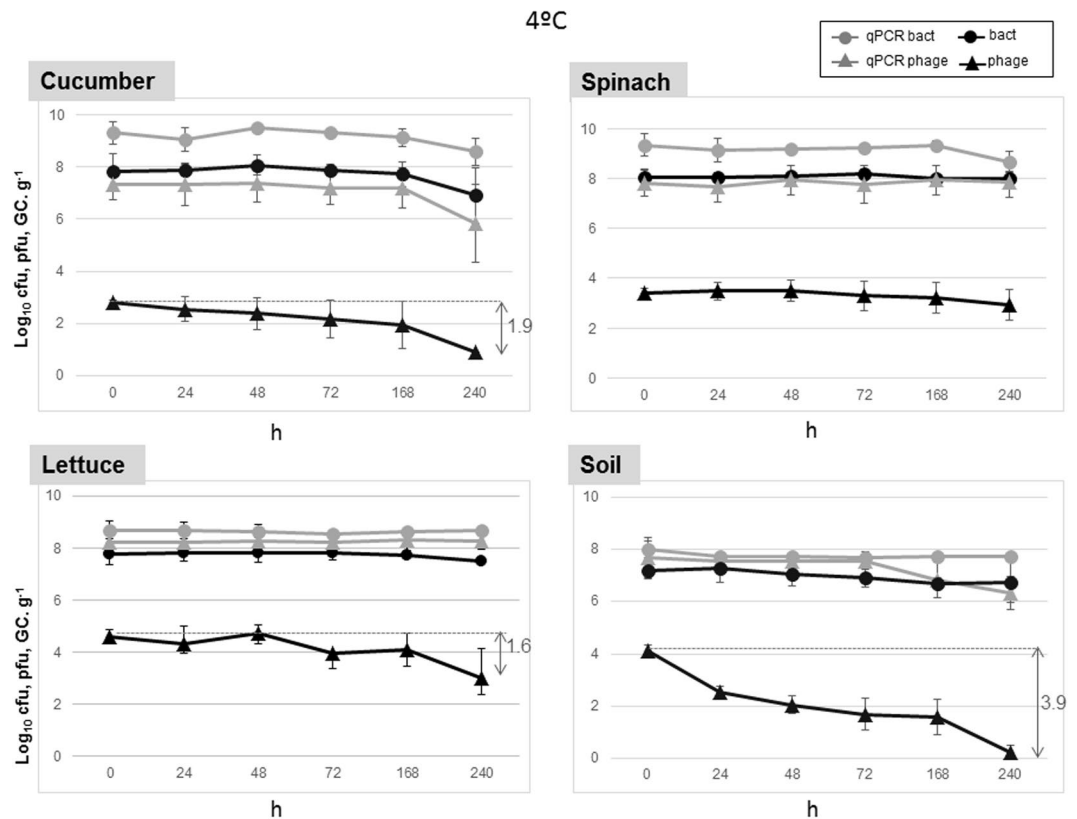


Figure 2. Stability of 933W and *E. coli* C600 (933W Δ stx::gfp-cat) after 10 days of storage at 4°C in the different matrices (cucumber, spinach, lettuce, and soil). Values for culturable bacteria are expressed in log₁₀ cfu.g⁻¹. Infectious phages were evaluated by plaque blot and values expressed as log₁₀ pfu.g⁻¹. Phage and bacterial genomes were evaluated by qPCR with the *stx* qPCR assay and the *gfp* qPCR assay, respectively, and the results are expressed as log₁₀ GC.g⁻¹. All results are the mean of three independent experiments. Those microorganisms showing significant ($P < 0.05$) reductions are indicated by a vertical arrow.

wastes are inadequately treated before land application, then viable pathogens may survive and grow in field soils and contaminate plants³⁷. Moreover, the same fields could be used to produce various crops, extending the risk of contaminating different vegetables. While measures and regulations envisage diverse bacterial and viral pathogens, little attention is paid to the presence of phages, compromising the safety of fresh produce.

Our results show that bacteria remained present and cultivable, and phages remained present and infectious in the samples tested after at least, 10 days of storage using two common storage temperatures. The survival of pathogenic STEC bacteria, including O157 serotype, has previously been demonstrated in leafy greens^{38–40} and in manure-amended cropland soil^{15,41,42}, showing reductions over 10 days in the same range as, or slightly higher than, the ones observed here. The minimal reduction observed at 23°C could have been balanced by regrowth of bacterial cells during the storage period, but if this is true, then it is assumed that the bacteria could remain metabolically active, hence being even more susceptible to Stx phage conversion. This metabolic activity does not always happen under natural conditions, where the bacteria could be starved or in a viable but not culturable state, rendering phage infection difficult.

However, the aim of this study was not to confirm bacterial stability, which has been demonstrated previously in more extended studies, as indicated above. Rather, the goal was to evaluate how Stx phages behave in these matrices. Our first observation is that Stx phages were present in the different types of vegetable and soil samples. Each sample of our study was collected from a different grocery or field. The diverse origin of the samples allows to get an overview of the occurrence of Stx phages in our area, but did not allow to correlate the presence of Stx phages with a particular site or field since only one sample from each field was analyzed. The ubiquity of free Stx phages, in particular Stx2 phages, in different environments has been extensively reported^{43–48}, including in commercial salad samples⁴⁵. In agreement with these studies, they were also detected in the present study, with a higher prevalence of free Stx2 phages than of Stx1 phages⁴⁹, and within an area of study with a relatively low incidence of STEC infections¹¹. The second observation is that at least some of the Stx phages in the samples had the capacity to propagate within the matrices, as shown in the experimental approach employed here. Some samples (e.g. spinachs samples) showed negative when analyzed directly. These negative results could be caused either by the absence of Stx phages or by the presence of low amounts of Stx phages below the detection limit of the method used. We determined that this second possibility was the reason of negative results in many cases, since these negative samples showed detection of Stx phages after they infect and multiply in the *E. coli* WG5 strain in the propagation experiments. After propagation, the densities of Stx phages reached in some cases the threshold

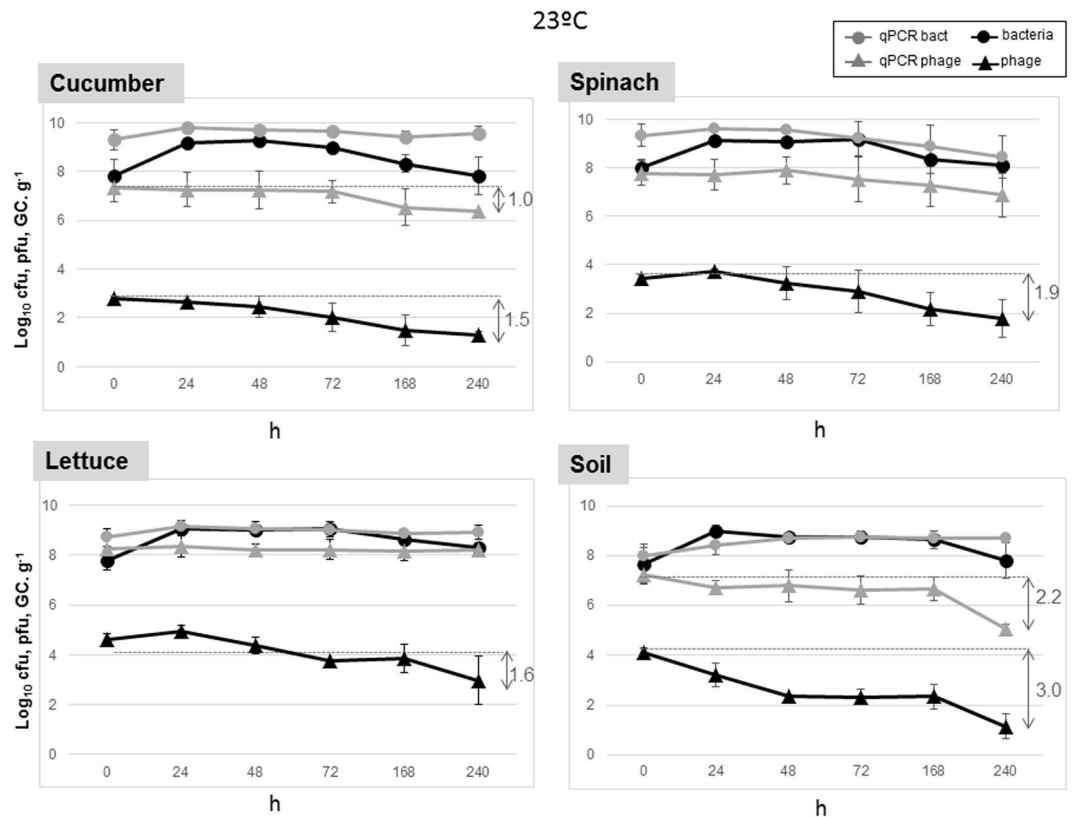


Figure 3. Stability of 933W and *E. coli* C600 (933W Δ stx::gfp-cat) after 10 days of storage at 23 °C in the different matrices (cucumber, spinach, lettuce, and soil). Values for culturable bacteria are expressed in log₁₀ cfu.g⁻¹. Infectious phages were evaluated by plaque blot and values expressed as log₁₀ pfu.g⁻¹. Phage and bacterial genomes were evaluated by qPCR with the *stx* qPCR assay and the *gfp* qPCR assay, respectively, and the results are expressed as log₁₀ GC.g⁻¹. All results are the mean of three independent experiments. Those microorganisms showing significant ($P < 0.05$) reductions are indicated by a vertical arrow.

required for their detection and some of the samples initially negatives appeared positive. The differences between Stx1 and Stx2 phages were again caused by the negative results obtained for Stx1 phages in many samples when directly analyzed. Some samples showed a low increase in Stx phages, that could be attributable to causes other than propagation or to experimental deviations. This could refer to; 1) a fraction of infectious Stx phages that have been randomly adsorbed to particles in the sample and are removed during the steps used for phage purification, 2) Stx phages that being infectious do not propagate efficiently in the host strain used, or 3) Stx phage particles (or generalized transducing particles carrying *stx*)^{50, 51} that are able to attach to and to introduce DNA in the host strain (and therefore are potentially able to generate transductants), but are not able to produce a new phage progeny. It is difficult to establish the minimum fold increase that could determine that propagation has occurred, and very low values of propagation can be doubtful. Nevertheless, the high increase in the GC number observed in many of the samples points towards the capacity of Stx phages to produce new particles after infecting *E. coli* WG5 strain, or in lesser extent other bacterial hosts in the matrices. Susceptibility to infection is the first step for *stx* conversion if the right metabolically active host can be reached. This is important because the detection of non-infective, or even defective Stx phages of phage-like particles, unable to transfer the gene as we suspect might sometimes be the case⁵², annuls the risk of *stx* transduction, and hence of the generation of new STEC.

The detection of non-infective Stx phages particles is one explanation of the lower values of infectious Stx phages in comparison with the qPCR values, that does not distinguish between infectious and non-infectious particles. It is also highlighted by the observed lack of correspondence between both results in some of the persistence experiments, in which the conditions could have inactivated the ability of infection of the phages but kept their DNA unaltered, in accordance with previous studies²⁶. The fact that some matrices (lettuce or sprouts) do not show correspondence between the reduction of infectious Stx phages and their qPCR values, whereas other matrices show also reduction in qPCR values, opens several possibilities. It can be considered that the characteristics of these particular matrices protect better the capsids and the phage DNA after ten days while affecting the phage attachment and DNA infection required for propagation. On the other hand, it could also be that the characteristics of the matrix could have favoured aggregation of the phage particles, reducing the numbers of PFU and allowing an easier elimination of aggregates through their adsorption on membranes than single virions⁵³, but maintaining the GC numbers intact.

As described in previous studies^{26, 54}, the persistence of Stx phages to different conditions confirms the role of phages as a reservoir of *stx*. If naturally occurring infectious Stx phages are present in vegetable and soil samples,

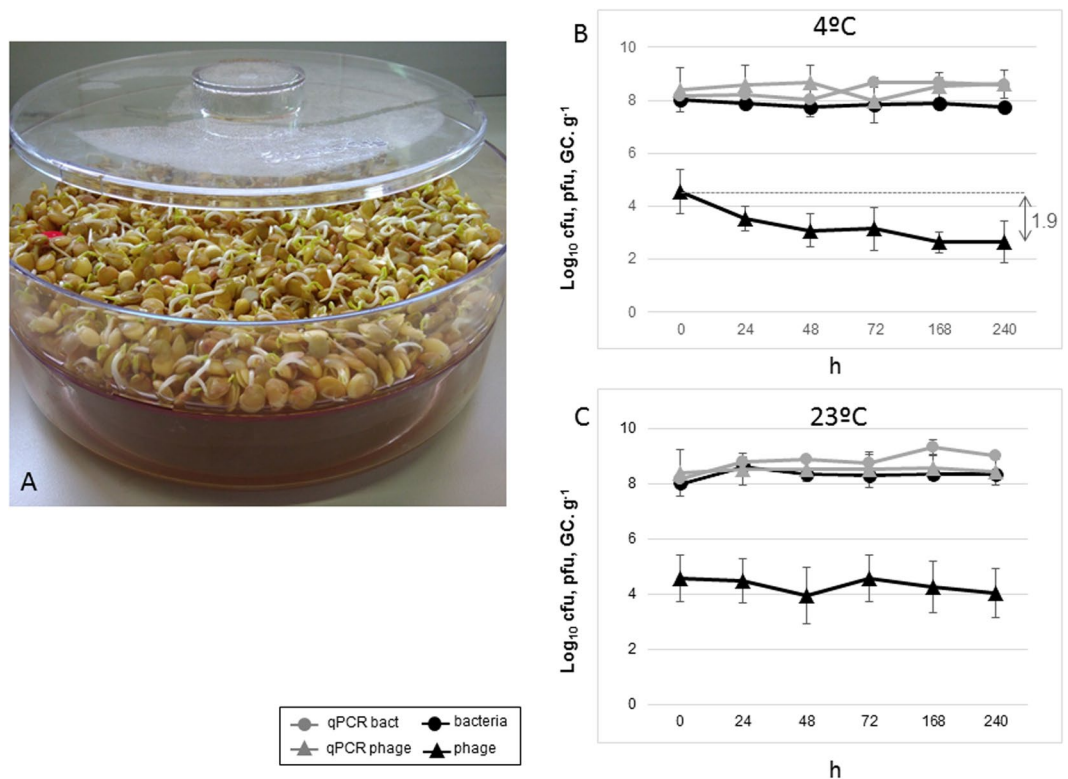


Figure 4. (A) Laboratory production of lentil sprouts in the germinator at 23 °C. (B) Stability of 933W and *E. coli* C600 (933W Δ stx::gfp-cat) in the sprouts after 10 days of storage at 4 °C. (C) Stability of 933W and *E. coli* C600 (933W Δ stx::gfp-cat) in the sprouts after 10 days of storage at 23 °C. Culturable bacteria (log₁₀ cfu.g⁻¹). Infectious Stx phages (log₁₀ pfu.g⁻¹). Phage and bacterial genomes were evaluated by qPCR (log₁₀ GC.g⁻¹). All results are the mean of three independent experiments. For each replicate, different sprouts were produced and used. Those microorganisms showing significant ($P < 0.05$) reductions are indicated by a vertical arrow.

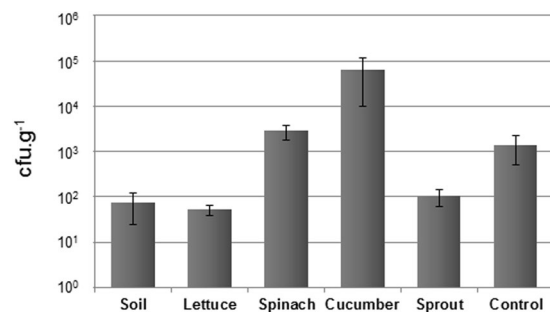


Figure 5. Transductants (cfu.g⁻¹) of phage 933W Δ stx:km in *S. sonnei* 866 generated in soil, lettuce, spinach, cucumber, and sprouts, and in LB broth at 23 °C. Results are the mean of four independent experiments.

where they can persist for a certain length of time and maintain the capacity to propagate, the transduction of *stx* to the background flora could, under the right conditions, take place. This should be a rare occurrence, and fortunately the high densities of host bacteria and Stx phages required for *stx* transduction in food matrices shown in previous studies²⁸, are not commonly found in food samples. Nevertheless, as demonstrated in our model, there was no restriction on transduction in the matrices analyzed, and new STEC could be generated, in accordance with previous studies on soil⁵⁵, salads²⁸, and biofilms⁵⁶. Given that three of our matrices are consumed raw (lettuce, sprouts, and cucumber), and even spinach may be included as a salad ingredient, the low number of transductants generated would be sufficient to pose a health problem.

The outbreak of *E. coli* O104:H4 in Europe²², in addition to the human casualties and health-associated costs, indicates that accidental STEC contamination or emergence due to Stx phage transduction events could unfortunately become a common occurrence. Protecting vegetables against possible deliberate, accidental, or natural microbial contamination is imperative to ensure a safe food chain. Methods to reduce microbial risks in the vegetable food chain should not neglect Stx phage elimination.

Methods

Bacterial strains, bacteriophages, and media. *E. coli* C600 (933W $\Delta stx_2::gfp::cat$) (Fig. S1)⁵⁷ and bacteriophage 933W (Fig. S1), induced from lysogenic *E. coli* C600 (933W)⁵⁸, were used to evaluate the persistence of STEC and Stx phages in vegetables and soil. *E. coli* WG5 (ATCC 700078) was used as the host strain to evaluate the infectivity of Stx phages. *Shigella sonnei* strain 866 (Tc^R) and recombinant phage 933W ($\Delta stx_2::kan$) (this study, Fig. S1) were used to generate lysogens in the different matrices.

Luria-Bertani (LB) broth and agar were used to culture bacteria and when necessary, media were supplemented with chloramphenicol (Cm) (15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), tetracycline (Tc) (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), and kanamycin (Km) (35 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Phages were enumerated using modified Scholtens Agar (MSA) (ISO 10705-2)⁵⁹ containing 6 mM CaCl₂ and 0.5% glycerol. Phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.46 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl [pH 7.4]) and phage buffer (PB) (22 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 85 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, and 0.1 mM CaCl₂) were used to prepare dilutions of bacteria and phages, respectively.

Samples and procedures. Fifteen lettuce, 15 cucumber, and 15 spinach samples were bought each in a different local supermarket in 2015–2016. A portion of ten g of each vegetal sample was used without further processing for Stx detection, persistence and propagation experiments. For the generation of transductants, to reduce the presence of background flora, samples were rinsed with 200 ml of sterile distilled water containing 2.5 ppm of free chlorine. Excess of liquid was removed from the sample before the experiments. Twenty six soil samples were collected from 6 greenhouses, 5 gardens, and 15 croplands in Barcelona (northeast Spain) (9) and Asturias (north Spain) (6). Ten g of each soil samples were used in all the experiments without further processing. From these, 16 were analyzed fresh for the occurrence of Stx phages and ten were stored at 4 °C for six months to evaluate the persistence of Stx phages after long term storage.

Lentils were sprouted in the laboratory from lentil seeds using a specific germinator (A. Vogel, bioSnacky) (Fig. 4). Seeds were irrigated twice a day with sterile mineral water at 23 °C for 4 days. After this period, sprouts were collected and used as matrices. The procedure was repeated and new sprouts were germinated for each independent experiment. Portions of ten g of sprouts were used without further processing.

For persistence experiments, 3 ml of *E. coli* C600 (933W $\Delta stx_2::gfp::cat$) culture at logarithmic phase of growth (*ca* 3×10^8 cells) and 5 ml of phage 933W (containing *ca* 10^8 pfu of phages) were inoculated in 10 g of each matrix and the samples incubated at 23 °C and 4 °C. The number of bacteria and phages was monitored from the mixture at different times (0, 24 h, 48 h, 72 h, 168 h, and 240 h).

To recover bacteria and phages, each sample was placed together with 20 ml of PBS in stomacher bags with filters (Afora, Barcelona, Spain) and homogenized using a Masticator (IUL Instruments GmbH, Königswinter, Germany) for 2 min. In soil samples, recovery of bacteria was performed as above. For the recovery of Stx phages from soil, in addition to the homogenization with 20 ml of PBS, the pH of the homogenate was increased at 8.5 with NaOH 0.1 N and by adding of 0.5 g of Beef extract (Sigma Aldrich, Ltd) (method adapted from ref. 60).

Bacteria were enumerated by colony counts and molecular detection (*gfp* qPCR)(Table 2). To evaluate Stx phages, the homogenate was filtered using low-protein-binding 0.22 μm -pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA, USA). The Stx phages in the filtrate were enumerated in *E. coli* WG5 strain and plaque blot and by molecular detection (*stx_2* qPCR), as described below.

Transduction experiments in the matrices were performed by inoculating 7 ml of a culture of *S. sonnei* strain 866 (Tc^R) at logarithmic phase of growth (*ca* 5×10^8 cells) and 9 ml of recombinant phage 933W ($\Delta stx_2::km$) (Fig. S1) (*ca* 10^8 phage particles from a purified phage lysate) in 10 g of each matrix at room temperature (23 °C) and incubated for 12 hours. Control was performed with the same volumes of phage and bacteria inoculated in 20 ml of LB broth and incubated under the same conditions. After incubation, the samples were homogenized as described above and the homogenate was used to assess the number of lysogens of *Shigella sonnei* (933W ($\Delta stx_2::kan$) generated by plating dilutions of the homogenate in LB agar plates containing Km and Tc. Lysogens were confirmed by PCR using Rho/Km-3 as primers (Table 2). All experiments and conditions were assayed in triplicate or more.

Preparation of phage lysates. LB cultures of the lysogens *E. coli* C600 (933W) or *E. coli* C600 (933W $\Delta stx_2::kan$) were grown at 37 °C under agitation (180 rpm) to reach an optical density (OD₆₀₀) of 0.3 as measured with a spectrophotometer (Spectronic 501; Milton Roy, Belgium). Freshly prepared mitomycin C (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) was added and the cultures were incubated overnight at 37 °C in the dark in a shaker to induce phages. After incubation, the cultures were filtered through low-protein-binding 0.22- μm -pore-size membrane filters (Millex-GP; Millipore, Bedford, MA, USA) and chloroform treated (1:20) (v:v).

Construction of the *E. coli* C600 (933W $\Delta stx_2::kan$) recombinant lysogen. *E. coli* C600 lysogenic for phage 933W was used to prepare a recombinant strain in which *kan* (conferring km resistance) cassette replaces a 369 bp fragment of the *stx_2A* gene (Fig. S1). For this purpose, plasmid pKD46 with the Red recombinase system⁶¹ was transformed in C600 (933W) strain⁵⁸. A *stx_2A*-*kan*-*stx_2B* amplicon was generated by PCR using *km5*-*stx*/*km3*-*stx* as primers (Table 2) and then purified and electroporated into the laboratory strain *E. coli* C600 (933W) containing pKD46 as previously described⁶².

Phage DNA and total DNA extraction. Phage lysates were treated with DNase (100 units. ml^{-1} of the phage lysate), proteinase K (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), and phenol/chloroform (1:1 v/v) (Sambrook and Russel, 2001). The mixture was added to Phase Lock Gel Tubes (5- Prime, Hucoa Erlöss, Madrid, Spain) and centrifuged following the manufacturer's instructions. DNA was precipitated using 100% ethanol and 3 M sodium acetate and resuspended in 50 μl of ultrapure water. Total (bacterial or phage) DNA was extracted from vegetables and soil using a

commercial kit, NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, Neander, Germany). DNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE).

Propagation of Stx phages in the matrices. The capacity of Stx2 and Stx1 phages in the samples to infect and propagate using *E. coli* WG5 as host was evaluated. Ten samples of each matrix, each sample collected from a different location, were used as replicates of a given type of sample. For each sample, two technical replicates were performed. To this end, one ml of the phage suspensions extracted from the matrix and quantified as described above were used to infect one ml (10^8 CFU/ml) of a culture containing *E. coli* WG5 grown at logarithmic phase in 8 ml of LB and incubated overnight at 37 °C. Phages were extracted from the enrichment and quantified by qPCR after incubation, and the number was compared with the original number of phages in the samples taking into account the dilution factor. Stx phages were considered as infectious when a significant ($P < 0.05$) increase in GC was observed in the supernatant from the enrichment cultures compared to the original homogenate (Fig. 1 positive bars). Stx phages were considered as not infectious when a significant ($P < 0.05$) decrease (Fig. 1 negative bars) or not significant ($P > 0.05$) changes in GC were observed in the supernatant from the enrichment cultures compared to the original homogenate.

In addition, long-term storage was evaluated in ten soil samples. These were stored at 4 °C for six months and Stx phages were extracted from 10 g of each sample as described above and were analyzed directly and after propagation in a *E. coli* WG5 culture enrichment.

Bacterial and phage quantification. Bacteria were monitored by colony counts from decimal dilutions in PBS and inoculation on LB agar supplemented when necessary with Cm, Km, or Tc at different time intervals and temperatures. Incubation was performed at 37 °C for 18 hours.

Infectious phages were evaluated in 1 ml of serial decimal dilutions of the phage suspensions or the homogenates in PBS at different times and temperatures using double-agar layer techniques^{59,63} and *E. coli* WG5 as the host strain. One milliliter of the culture was mixed with MSB soft agar (MSB broth with 0.7% agarose)⁵⁹ supplemented with 6 mM CaCl₂ and 0.5% glycerol for optimal visualization of the plaques. After incubation, and since Stx plaques generated by Stx phages are difficult to visualize, plaques were enumerated after plaque blot hybridization performed as described below.

For molecular detection of bacteria and phages, the *gfp* assay (Table 2) was used to detect *E. coli* C600 (933W Δ *stx*₂::*gfp*::*cat*), and *stx*₁ and *stx*₂ qPCR assays (Table 2) were used to detect Stx phages in the samples and to enumerate phage 933W. Since Stx phages are known to carry only one *stx* copy, each *stx* copy was considered an individual phage particle.

Plaque blot hybridization. To better quantify the plaques of lysis for detection of the *stx*, plaques were transferred to a nylon membrane (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Spain) using a standard procedure⁶⁴. Hybridization was performed as previously described (García-Aljaro *et al.*⁶⁵). The nylon membranes were hybridized at 65 °C with a digoxigenin-labeled *stx*₂ probe²⁹. Hybridization was accomplished with the DIG-DNA labeling and detection kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain), following the manufacturer's instructions.

Standard and qPCR procedures. Standard PCRs were performed using a GeneAmp PCR system 2400 (PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain). The primers used are described in Table 2. qPCR assays (Table 2) were performed as previously described under standard conditions in a Step One RT PCR System (Applied Biosystems). Genes were amplified in a 20 μ l reaction mixture with the PCR Master Mix (Applied Biosystems). The reaction contained 1 or 9 μ l of the DNA sample or quantified plasmid DNA. All samples were run in triplicate, as well as the standards and negative controls. GC was defined as the mean of the triplicate data obtained.

Statistics. Statistical tests were performed using the Statistical Package for Social Science software (SPSS). One or two-way analysis of variance (ANOVA) was used to assess whether the values of each microorganism showed significant reductions at each temperature assayed. A paired Student's-T test was used to evaluate the differences between Stx phage GC before and after enrichment. For all statistical analyses, P-values below 0.05 were considered significant.

Data availability statement. All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

References

1. Reilly, A. Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: memorandum from a WHO meeting. WHO Consultation on Prevention and Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections. *Bull. World Health Organ.* **76**, 245–255 (1998).
2. Monaghan, A. M. *et al.* Characterization of farm, food, and clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O113. *Foodborne Pathog. Dis.* **9**, 1088–96 (2012).
3. Scheutz, F. *et al.* Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2951–63 (2012).
4. Khalil, R. K. S., Skinner, C., Patfield, S. & He, X. Phage-mediated Shiga toxin (Stx) horizontal gene transfer and expression in non-Shiga toxinogenic *Enterobacter* and *Escherichia coli* strains. *Pathog. Dis.* **74** (2016).
5. Boerlin, P. *et al.* Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 497–503 (1999).
6. Tesh, V. L. *et al.* Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect. Immun.* **61**, 3392–402 (1993).
7. Muniesa, M. & Schmidt, H. In *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology* (ed. Morabito, S.) (Caister Academic Press, 2014).
8. Johannes, L. & Römer, W. Shiga toxins—from cell biology to biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 105–16 (2010).

9. Feiner, R. *et al.* A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 641–650 (2015).
10. Oppenheim, A. B., Kobilier, O., Stavans, J., Court, D. L. & Adhya, S. Switches in bacteriophage lambda development. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 409–29 (2005).
11. Martínez-Castillo, A., Quirós, P., Navarro, F., Miró, E. & Muniesa, M. Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4862–8 (2013).
12. Bonardi, S. *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157, O26 and O111 in cattle faeces and hides in Italy. *Vet. Rec. open* **2**, e000061 (2015).
13. Gyles, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* **85**, E45–62 (2007).
14. Berger, C. N. *et al.* Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* **12**, 2385–97 (2010).
15. Semenov, A. & Franz, E. Estimating the stability of *Escherichia coli* O157: H7 survival in manure-amended soils with different management histories. *Environ. Microbiol.* **10**, 1450–9 (2008).
16. Tyler, H. L. & Triplett, E. W. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 53–73 (2008).
17. Michino, H. *et al.* Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* **150**, 787–96 (1999).
18. Marder, E. P., Garman, K. N., Ingram, L. A. & Dunn, J. R. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bagged salad. *Foodborne Pathog. Dis.* **11**, 593–5 (2014).
19. Heaton, J. C. & Jones, K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 613–626 (2008).
20. Teplitski, M., Barak, J. D. & Schneider, K. R. Human enteric pathogens in produce: un-answered ecological questions with direct implications for food safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 166–71 (2009).
21. Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D. A. C. & Bending, G. D. Human pathogens and the phyllosphere. *Adv. Appl. Microbiol.* **64**, 183–221 (2008).
22. Buchholz, U. *et al.* German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1763–70 (2011).
23. Muniesa, M., Hammerl, J. A., Hertwig, S., Appel, B. & Brüssow, H. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4065–73 (2012).
24. Knödler, M., Berger, M. & Dobrindt, U. Long-term survival of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain on fenugreek seeds. *Food Microbiol.* **59**, 190–195 (2016).
25. Baquero, F. & Tobes, R. Bloody coli: a gene cocktail in *Escherichia coli* O104:H4. *MBio* **4**, e00066–13 (2013).
26. Allué-Gardia, A., Martínez-Castillo, A. & Muniesa, M. Persistence of infectious Shiga toxin-encoding bacteriophages after disinfection treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2142–9 (2014).
27. Tóth, I. *et al.* Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7242–7 (2003).
28. Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R. & Muniesa, M. Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1764–8 (2009).
29. Muniesa, M., Serra-Moreno, R. & Jofre, J. Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the stx genes appeared conserved. *Environ. Microbiol.* **6**, 716–25 (2004).
30. Harris, L. J. *et al.* Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**, 78–141 (2003).
31. Everis, L. Risks of pathogens in ready-to-eat fruits, vegetables, and salads through the production process. *Campden BRI Review* **R44**, 1–160 (2004).
32. Franz, E. & van Bruggen, A. H. C. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. *Crit. Rev. Microbiol.* **34**, 143–61 (2008).
33. Solomon, E. B., Yaron, S. & Matthews, K. R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 397–400 (2002).
34. Bernstein, N., Sela, S., Pinto, R. & Ioffe, M. Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of maize via the root system. *J. Food Prot.* **70**, 471–5 (2007).
35. Sikin, A. M., Zoellner, C. & Rizvi, S. S. H. Current Intervention Strategies for the Microbial Safety of Sprouts. *J. Food Prot.* **76**, 2099–2123 (2013).
36. Bradford, S. A. *et al.* Transport and Fate of Microbial Pathogens in Agricultural Settings. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **43**, 775–893 (2013).
37. USDA. *Safe Practices for Food Processes - Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce: Chapter IV. Outbreaks Associated with Fresh and Fresh-Cut Produce.* In. (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2015).
38. Delbeke, S., Ceuppens, S., Jacxsens, L. & Uyttendaele, M. Survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on strawberries, basil, and other leafy greens during storage. *J. Food Prot.* **78**, 652–60 (2015).
39. Macarisin, D., Patel, J., Bauchan, G., Giron, J. A. & Ravishankar, S. Effect of Spinach Cultivar and Bacterial Adherence Factors on Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on Spinach Leaves. *J. Food Prot.* **76**, 1829–1837 (2013).
40. Tomás-Callejas, A. *et al.* Survival and distribution of *Escherichia coli* on diverse fresh-cut baby leafy greens under preharvest through postharvest conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **151**, 216–222 (2011).
41. Yao, Z., Yang, L., Wang, H., Wu, J. & Xu, J. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 in agricultural soils amended with different organic fertilizers. *J. Hazard. Mater.* **296**, 30–36 (2015).
42. Ma, J., Mark Ibekwe, A., Crowley, D. E. & Yang, C.-H. Persistence of *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains in agricultural soils. *Sci. Total Environ.* **490**, 822–829 (2014).
43. Muniesa, M. & Jofre, J. 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 (1998).
44. Imamovic, L., Ballesté, E., Jofre, J. & Muniesa, M. Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5693–701 (2010).
45. Imamovic, L. & Muniesa, M. Quantification and evaluation of infectivity of shiga toxin-encoding bacteriophages in beef and salad. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3536–3540 (2011).
46. Rooks, D. J. *et al.* Development and validation of a qPCR-based method for quantifying Shiga toxin-encoding and other lambdoid bacteriophages. *Environ. Microbiol.* **12**, 1194–204 (2010).
47. Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Jacobs, E. & Röske, I. Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**, 48–53 (2006).
48. Yan, Y. *et al.* 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 (2011).
49. Grau-Leal, F., Quirós, P., Martínez-Castillo, A. & Muniesa, M. Free Shiga toxin 1-encoding bacteriophages are less prevalent than Shiga toxin 2 phages in extraintestinal environments. *Environ. Microbiol.* **17**, 4790–801 (2015).

50. Martínez-Castillo, A. & Muniesa, M. 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.* **4**, 46 (2014).
51. Thierauf, A., Perez, G. & Maloy, A. S. Generalized transduction. *Methods Mol. Biol.* **501**, 267–86 (2009).
52. Quirós, P., Brown-Jaque, M. & Muniesa, M. Spread of bacterial genomes in packaged particles. *Future Microbiol.* **11**, 171–3 (2016).
53. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R. & Górski, A. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol. (Praha)*. **56**, 191–200 (2011).
54. Muniesa, M., Lucena, F. & Jofre, J. Comparative survival of free shiga toxin 2-encoding phages and *Escherichia coli* strains outside the gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5615–8 (1999).
55. Nyambe, S., Burgess, C., Whyte, P. & Bolton, D. The Survival of a Temperate vtx Bacteriophage and an Anti-Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 Lytic Phage in Water and Soil Samples. *Zoonoses Public Health*, doi:10.1111/zph.12278 (2016).
56. Urdahl, A. M., Solheim, H. T., Vold, L., Hasseltvedt, V. & Wasteson, Y. Shiga toxin-encoding genes (*stx* genes) in human faecal samples. *APMIS* **121**, 202–10 (2013).
57. Quiros, P., Martínez-Castillo, A. & Muniesa, M. 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 (2015).
58. O'Brien, A. D. *et al.* Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**, 694–6 (1984).
59. Anonymous. ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages - part 2: Enumeration of somatic coliphages. (2000).
60. Lasobras, J., Dellunde, J., Jofre, J. & Lucena, F. Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 723–9 (1999).
61. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640–5 (2000).
62. Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J. P., Jofre, J. & Muniesa, M. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Mol. Biol.* **7**, 31 (2006).
63. Adams, M. H. In *Bacteriophages* 592 (1959).
64. Sambrook, J. & Russell, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY* 999 (2001).
65. García-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J. & Blanch, A. R. Prevalence of the *stx 2* Gene in Coliform Populations from Aquatic Environments. **70**, 3535–3540 (2004).
66. Muniesa, M. *et al.* 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**, 4554–62 (2003).
67. Quirós, P., Martínez-Castillo, A. & Muniesa, M. 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 (2015).
68. Imamovic, L., Ballesté, E., Martínez-Castillo, A., García-Aljaro, C. & Muniesa, M. Heterogeneity in phage induction enables the survival of the lysogenic population. *Environ. Microbiol.* **18**, 957–69 (2016).
69. Imamovic, L., Serra-Moreno, R., Jofre, J. & Muniesa, M. Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1105–14 (2010).

Acknowledgements

This study was supported by Spanish Ministerio de Innovación y Ciencia (AGL2012-30880 and AGL2016-75536-P), the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the European regional fund (ERF) the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043) and the Centre de Referència en Biotecnologia (XeRBa). P. Quirós received grant from the Spanish Ministry. Authors thank Prof. F. de la Cruz for providing plasmid pOX38 containing *kan*.

Author Contributions

Conception and design: M.M. Acquisition of data: P.Q. Laboratory analysis: P.Q. Analysis and interpretation of data: P.Q. Drafting Manuscript: P.Q. and M.M. Review of manuscript: P.Q. and M.M.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-08169-6

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

4.4. CAPÍTULO 4:

Mejora de la detección de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga por métodos moleculares mediante la reducción de la interferencia de los bacteriófagos Stx.

MEJORA DE LA DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA POR MÉTODOS MOLECULARES MEDIANTE LA REDUCCIÓN DE LA INTERFERENCIA DE LOS BACTERIÓFAGOS STX.

Pablo Quirós, Alexandre Martínez-Castillo y Maite Muniesa.

Applied Environmental Microbiology. 2015 Jan; 81(1):415-21.

Introducción

Escherichia coli productoras de toxinas Shiga (STEC) son patógenos entéricos capaces de provocar graves trastornos gastrointestinales y enfermedades severas como la colitis hemorrágica, que puede desarrollar complicaciones como la insuficiencia renal aguda (síndrome urémico hemolítico, en inglés, *Hemolytic Uremic Syndrome*; HUS) que podría requerir un tratamiento de por vida (Nataro and Kaper, 1998; Tarr *et al.*, 2005).

La identificación de cepas STEC requiere un aislamiento previo mediante enriquecimiento en un medio selectivo. Sin embargo, el aislamiento de la cepa responsable de una enfermedad o brote no siempre es posible porque podría estar presente en concentraciones bajas, las células podrían no estar en un estado cultivable, o podría haber interferencia de otras *E. coli* comensales dentro de la microbiota de la muestra. Por ese motivo, la necesidad de una identificación temprana de STEC exige el uso de métodos más rápidos y robustos.

Se han desarrollado métodos de detección de ADN y proteínas para identificar los genes relacionados con la virulencia (Paton and Paton, 2003; Bibbal *et al.*, 2014; Kagkli *et al.*, 2011) y los genes que ayudan a identificar un serotipo específico (Maurer *et al.*, 1999), que han resultado ser muy útiles para patógenos conocidos. Muchos métodos basados en ADN para la detección de STEC incluyen técnicas de PCR (Paton and Paton, 2003; Bibbal *et al.*, 2014; Kagkli *et al.*, 2011; Perelle *et al.*, 2004; Gould *et al.*, 2009; Tseng *et al.*, 2014), y están apareciendo nuevos protocolos de secuenciación masiva. Sin embargo, el reciente brote causado por *E. coli* O104: H4 en Alemania (Baquero and Tobes, 2013) puso de manifiesto las limitaciones de los métodos basados en la detección de serotipos bien conocidos cuando existe un patógeno inusual. Por otro lado, es necesario el aislamiento de la cepa bacteriana a fin de confirmar la presencia de STEC. Esto es debido a que el principal determinante de virulencia de STEC, responsable de las complicaciones más indeseables de la infección, es la toxina Shiga (Stx). Los genes *stx* están codificados en el genoma de bacteriófagos atemperados (fagos Stx) insertados como profagos en el cromosoma de STEC (Muniesa and Schmidt, 2014) o en otras bacterias entéricas, como *Shigella* o *Citrobacter* (Schmidt *et al.*, 1993).

Los fagos Stx se pueden encontrar como fagos libres en ambientes que incluyen aguas residuales urbanas y de animales (Imamovic *et al.*, 2010; Rooks *et al.*, 2010), heces humanas (Martinez-Castillo *et al.*, 2013; Loman *et al.*, 2013) e incluso alimentos (Imamovic and Muniesa 2011), y son persistentes en el medio natural (Muniesa *et al.*, 1999; Allué-Guardia *et al.*, 2014; Rode *et al.*, 2011).

Cuando se aplican métodos basados en PCR y secuenciación masiva (NGS) para detectar STEC, la presencia de fagos Stx libres en la muestra representa un problema, ya que estos fagos pueden generar resultados positivos que pueden ser interpretados como pertenecientes a STEC sin que la bacteria esté presente.

Por otro lado, los protocolos de aislamiento bacteriano, que normalmente incluyen una etapa previa de enriquecimiento selectivo, pueden propagar bacteriófagos presentes en la muestra, lo que puede causar la lisis de las bacterias que se pretenden aislar.

Objetivos

Los principales objetivos del estudio fueron, por un lado confirmar la hipótesis de que la interferencia de los bacteriófagos en los métodos utilizados actualmente para detectar STEC pueden causar falsos positivos. Por otro lado desarrollar un método para eliminar o reducir la presencia de fagos Stx libres en diferentes tipos de muestras, con el objetivo de minimizar su interferencia en los métodos de detección de STEC basados en ADN.

Resultados

Comparación de métodos de extracción de ADN

Se extrajo ADN fágico de una suspensión del fago Stx 933W con diversos kits de extracción. Todos los métodos mostraron eficiencias similares, y la cuantificación de *stx* en el ADN fágico no mostró diferencias significativas entre el método diseñado específicamente para la extracción de ADN fágico y los métodos comerciales destinados a la extracción de ADN total (bacteriano y fágico) (Figura 2). Estos resultados confirman que los protocolos habituales de extracción de ADN también extraen ADN fágico cuando se procesan muestras de alimentos, ambientales o clínicas.

Reducción de fagos

Las muestras se filtraron a través de dos filtros de membrana diferentes: una membrana de ésteres de celulosa de tamaño de poro de 0,45 μm y una membrana de PVDF de igual tamaño de poro, y de baja adsorción proteica. La filtración fue seguida por una, dos o tres etapas de lavado con PBS. Después de la filtración, se recuperaron los fagos 933W del filtro y se cuantificaron mediante qPCR. La reducción en el número de fagos en la muestra se comparó con los de la muestra no filtrada. El uso de membranas de PVDF de baja adsorción proteica presentó una mayor reducción (2,4 \log_{10} CG/ μl) respecto a los filtros de ésteres de celulosa (0,8 \log_{10} CG/ μl). Tres pasos de lavado con PBS en lugar de uno aumentó la reducción de los fagos hasta 3,3 \log_{10} CG/ μl .

Recuperación bacteriana

El procedimiento de reducción de fagos no afectó negativamente a la recuperación bacteriana. El mismo procedimiento fue repetido añadiendo a las muestras *E.coli* DH5 α o un lisógeno de *E.coli* C600 conteniendo el fago 933W*gfp::cat*. El número de células cultivables fue evaluado en agar LB

para *E. coli* DH5 α o en LB más Cm para *E. coli* C600 (933W*gfp::cat*) a 37 °C. El número de bacterias en las muestras no filtradas no fueron significativamente diferentes del número de bacterias recuperadas del filtro (Figura 3). Por otro lado el filtrado conteniendo los fagos no presentó ninguna bacteria cultivable, confirmando que todas se retuvieron en el filtro.

Evaluación del procedimiento con diferentes concentraciones de bacteria y fago

Para evaluar la influencia de diversas densidades de fagos Stx o células bacterianas cultivables, evaluamos el protocolo de eliminación de fagos a concentraciones decrecientes de bacterias cultivables *E. coli* C600 (933W*gfp*) (de 10⁵ a 10² UFC/ml) en combinación con concentraciones decrecientes de fago 933W (10⁴ a 10¹ CsG/ μ l). Las bacterias fueron evaluadas por qPCR detectando el gen *gfp* introducido en la bacteria y los fagos por qPCR del gen *stx*. La extracción de ADN se realizó para cada mezcla con y sin aplicación del procedimiento de filtración y lavado. Como antes, las diferencias en el número de bacterias cultivables entre las muestras filtradas y no filtradas no fueron significativas. En cambio, la concentración de 933W cayó por debajo del límite de detección en las muestras filtradas (Figura 4).

Procedimiento de reducción de fagos en alimentos y muestras de heces

El método fue probado con diferentes matrices: PBS (control), agua de río, ensalada, carne picada y heces humanas. A las muestras se añadió *E. coli* C600 (933W*gfp*) y fago 933W (aproximadamente 10⁵ CG/ μ l de bacteria o fagos). De nuevo y para reproducir el procedimiento real, las bacterias y los fagos se evaluaron a partir de una sola extracción de ADN y por qPCR (ensayo de qPCR de *stx* para fagos y ensayo de *gfp* para bacterias) comparándose los valores entre muestras filtradas y no filtradas.

Se obtuvieron reducciones significativas en el número de fagos Stx en todas las matrices analizadas sin ninguna reducción significativa de *E. coli* C600 (933W*gfp*). La eficiencia de reducción varió entre las diferentes matrices (Figura 5). Las muestras líquidas mostraron las mejores reducciones; en muestras sólidas, el procedimiento requirió de una leve sedimentación (300g, 10 min) de la muestra para evitar el colapso de las membranas de filtro, lo que reduciría la eficacia del procedimiento.

Discusión

Existen un gran número de descripciones en los que hay detección positiva de *stx* por técnicas de PCR o qPCR en diversas muestras, pero después no se logra aislar una cepa STEC (Martinez-Castillo and Muniesa, 2014; Urdahl *et al.*, 2013). Esto podría deberse a varias causas; al tratamiento previo de antibióticos, a un diagnóstico de la enfermedad demasiado tardío, a la presencia de *E. coli* u otra flora comensal en la muestra, incluso a la presencia de microorganismos viables pero no cultivables, o simplemente porque la bacteria diana está presente en números demasiado bajos. Sin embargo, aquí presentamos una nueva consideración: la presencia de fagos Stx en las muestras y su interferencia en la detección positiva de la PCR o su inclusión en las secuencias generadas por NGS. Esta posibilidad es muy real, ya que los fagos Stx son abundantes en muchos ambientes, incluyendo

el intestino humano (Rooks *et al.*, 2010; Martinez-Castillo *et al.*, 2013; Imamovic and Muniesa, 2011; Imamovic *et al.*, 2010).

Este estudio confirma que los métodos utilizados para la extracción de ADN bacteriano en estas matrices complejas (International Organization for Standardization, 2012; Grys *et al.*, 2009; Monday *et al.*, 2007) también extraen el ADN del fago. La detección de *stx* podría considerarse indicativa de la presencia de STEC, pero si procede de un fago, la potencial amenaza para el ser humano es mucho menos importante, y esto debe ser considerado.

El hecho de que algunos fagos estuvieran todavía presentes en las muestras después del procedimiento, incluso a bajas concentraciones, podría representar un problema si se realizara un enriquecimiento con las muestras, permitiendo que los fagos se multipliquen. Sin embargo, en el caso de los fagos *Stx*, es poco probable, porque su capacidad de replicación es baja. La eliminación completa de todos los fagos presentes en las muestras no puede lograrse con el método presentado aquí, pero sí se consigue una reducción muy razonable en las poblaciones de fagos. El protocolo propuesto es fácil y factible de realizar, pudiendo aplicarse en laboratorios de rutina, ya que no afecta en la recuperación bacteriana. La reducción de las posibles interferencias por fagos podría mejorar la eficiencia y la fiabilidad de las técnicas genómicas cuando se aplican rutinariamente.

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 log₁₀ 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

TABLE 1 Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence (5'–3') ^a	Amplimer size (bp)	Function or description	Reference or source
tRNA _{sup}	TCTGCATTATGCGTTGTT	224	Upstream <i>stx</i> _{2A}	This study
Stx2a-gfpTir5	TAAAGTTAATCAGAATTC <u>AAAACCCAGTAACAGGCAC</u>		Overlapping of <i>gfp</i> gene and <i>stx</i> _{2A}	This study
GfpTir up	GAATTCTGATTAACCTTA	753	Entire <i>gfp</i> gene from pGreen TIR vector	This study
GfpTir lp	TTATTTGTAGAGCTCATCC			
GfpTir lp-cm5	GAAGCAGCTCCAGCCTACACATTTATTTGTAGAGCTCATCC		Overlapping of <i>gfp</i> gene and <i>cat</i>	
Gfp short-up	TCCATCTTCAATGTTGTGTCT	211	<i>gfp</i> fragment for qPCR standard	This study
Gfp short-lp	GAACATAAGACACGCTGCTGA			
Cm 5	TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1015	<i>cat</i> gene	31
Cm-3	CATATGAATATCCTCCTTAG			
Cm3-stx	<u>CTAAGGAGGATATT</u> CATATGAGGAGTTAAGTATGAAGAAG	281	Overlapping <i>cat</i> - <i>stx</i>	31
Stx2Blp	TCAGTCATTATTAACCTG		Final codon of <i>stx</i> _{2B}	This study
UP378	GCGTTTGACCATCTTCGT	378	378-bp <i>stx</i> _{2A} fragment	32
LP378	ACAGGAGCAGTTTCAGACAG			
RR46 LP	GAGCTCTAAGGAGGTTAT	457	Red recombinase in pKD46	31
RR46-UP	GTGCAGTACTCATTCGTT			
GFPTir-F	GCTTCCATCTCAATGTTGTGTCT	121	Real-time PCR for <i>gfp</i> gene	This study
GFPTir-R	CATTCTTGGACACAAATTGGAATACAAC			
GFPTir- probe	FAM-CATGGCAGACAAACAA-NFQ			
STX-Any f	ACGGACAGCAGTTATACCACTCT	65	Real-time PCR for <i>stx</i> ₂ gene	29
STX-Any r	ACGTTCGGAATGCAAATCAG			
STX-Any probe	FAM-CCAGCGCTGCGACACG-NFQ			

^aOverlap region is underlined.

STEC in a sample, the presence of free Stx phages in the sample (or other phages that could harbor virulence genes) represents a challenge since the phages can generate amplimers (PCR) or reads (NGS) that may be interpreted as belonging to STEC while they in fact belong to the phages. Moreover, when the protocols include a previous step of selective enrichment of the target bacteria, the step may also maintain or even propagate bacteriophages. The present study attempts (i) to confirm this possibility and (ii) to develop a method to eliminate or reduce the presence of free Stx phages in different samples, with the goal of minimizing their interference in DNA-based STEC detection methods.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria, bacteriophage plasmids, and media. Bacteriophage 933W was used in the experiments as a positive control. Phage 933W was induced from lysogenic *E. coli* strain C600 (933W) (27) and purified as described below. *E. coli* DH5 α was used as a control of culturable bacteria. An *E. coli* C600 lysogen containing a modified 933W phage in which a fragment of the *stx* gene was replaced by the gene encoding the green fluorescent protein (*gfp*) and the gene encoding chloramphenicol resistance (*cat*), constructed as described below, was used to enumerate culturable bacteria and to distinguish bacteria from free Stx phages using quantitative PCR (qPCR). A pGEM-T-Easy cloning vector (Promega Co., Madison, WI) was used for the construction of standard curves. *E. coli* C600 (pGEM::*stx*₂) (19) or plasmid pGreen TIR (28) containing the *gfp* gene was used to prepare the standards for the qPCR assays. Luria-Bertani (LB) broth or LB agar was used for bacteria cultivation and phage assays. When necessary, medium was supplemented with chloramphenicol (Cm) (20 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Preparation of bacteriophage 933W suspension. Lysogen *E. coli* C600 (933W) was incubated under agitation (180 rpm) at 37°C to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.3, as measured with a spectrophotometer (Spectronic 501; Milton Roy, Belgium). To induce 933W bacteriophages, mitomycin C (0.5 μ g/ml) was added to the culture and incubated overnight at 37°C in the dark in a shaker. Phage lysates were prepared by filtration of the bacterial cultures through low-protein-bind-

ing 0.22- μ m-pore-size membrane filters (Millex-GP; Millipore, Bedford, MA, USA). The supernatant was treated with DNase (100 units/ml of the phage lysate) to eliminate free DNA outside the phage particles. Phage DNA was extracted using different methods, as described below.

Standard and commercial DNA extraction methods. A phage DNA purification method was used to extract DNA from the 933W suspension as described previously (29). The concentration and purity of the phage DNA extracted were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies/Thermo Scientific Instruments, Wilmington, DE, USA).

In addition, phage 933W DNA was extracted using three commercial DNA extraction methods applied for bacterial or total DNA extraction, according to the manufacturers' instructions, as follows: QIAamp DNA Blood minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), QIAamp DNA Stool minikit (Qiagen), and NucliSENS miniMAG (bioMérieux España, Madrid, Spain). The phage count results from the commercial methods were compared with the specific protocol applied for bacteriophage DNA extraction.

Construction of the *E. coli* C600 (933W Δ *stx*::*gfp*::*cat*) recombinant lysogen. *E. coli* C600 lysogenic for phage 933W was used to prepare a recombinant strain in which *stx* was replaced by the *gfp* gene amplified from plasmid pGreen TIR (28) and a *cat* (chloramphenicol resistance) gene. A 224-bp fragment including the 5' region of the *stx*_{2A} subunit was amplified with tRNA_{sup}/Stx2a-gfpTir5 primers (Table 1), where the second primer overlaps *gfp*. The 753-bp *gfp* gene was amplified from plasmid pGreen TIR with primers GfpTir up/GfpTir lp-cm5, with the second primer overlapping *cat*. The 1,015-bp *cat* gene was amplified with primers cm5/cm3, and, finally, a 281-bp fragment of the *stx*_{2B} subunit was amplified with primers Cm3-stx/Stx2Blp, with the first primer overlapping *cat*. A single *stx*_{2A}-*gfp*-*cat*-*stx*_{2B} amplimer was generated by overlap extension PCR and then purified and electroporated into the laboratory lysogen *E. coli* C600 (933W) containing pKD46 (30) with the Red recombinase system. The recombinant phage 933W Δ *stx*::*gfp*::*cat* (hereafter, 933Wgfp) was constructed using previously described methods (31) by recombination of the fragment into the late gene region of the Stx phage, replacing the sequence of the *stx*₂ target gene (Fig. 1). The *cat* gene was introduced in the construct to prevent spontaneous induction of phage 933Wgfp

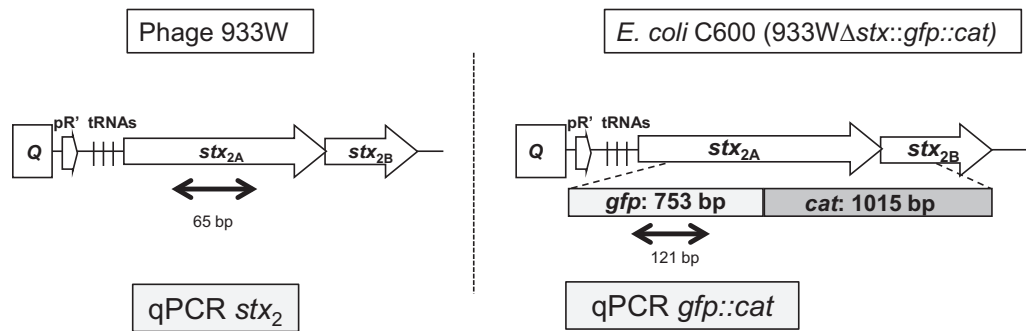


FIG 1 Schematic representation of the genetic organization of the *stx* operon in phage 933W in the STEC strain and the replacement of the *stx₂* gene by the *gfp-cat* fragment in *E. coli* C600 (933Wgfp). The schemes indicate where the fragments amplified by the qPCR assays for *stx* and *gfp* are located. Q, antiterminator gene; pR, late phage promoter.

from the *E. coli* C600 (933Wgfp) lysogen by growing the strain in the presence of Cm.

Phage reduction procedure. Phosphate-buffered saline (PBS) was spiked with various volumes of the 933W phage suspension. The spiked samples were evaluated in parallel with and without a previous filtration step. Volumes of 10 ml of each sample were filtered through 0.45- μ m-pore-size mixed cellulose ester filters, commonly used for filtration in microbiological analyses (EZ-Pak membrane filter; Millipore, Bedford, MA, USA), or through 0.45- μ m-pore-size low-protein-binding polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Durapore membrane filter; Millipore, Bedford, MA, USA), which allowed bacteriophages to pass through but retained bacteria. To further remove phages retained in the filters, one or three washing steps were additionally applied. For each wash, 10 ml of PBS was added to the surface of the filter, gently agitated, and removed by filtration.

In addition, the phage reduction procedure with PVDF membranes was tested in PBS spiked with various volumes of *E. coli* DH5 α or *E. coli* C600 (933Wgfp) bacterial cultures, and bacteria were recovered after three washing steps. Results of culturable bacteria were compared with and without a previous filtration step.

Phages and/or bacteria retained in the filter after the filtration procedure and the washing steps were recovered by suspending the membrane in the same volume of PBS as the original sample, shaking the membrane for 10 min by gentle rotation (horizontal shaker, Magna-AS15; Magna-Equipments, Barcelona, Spain) at room temperature, and vortexing for 1 min. The filtrate was recovered in sterile 50-ml bottles and monitored for the presence of phages or bacteria as described below. Phages were monitored by qPCR as described below. Culturable *E. coli* was enumerated by serial decimal dilutions in PBS, and 100 μ l was spread on LB agar plates or LB medium supplemented with Cm using a surface spread plate technique. The plates were incubated at 37°C for 18 h. To confirm that the reductions observed were due to the filtration procedure, in some experiments the filtrate was also analyzed for the presence of phages and bacteria.

Samples. The procedure was tested in different matrices in addition to PBS. A mixture of stools obtained from five healthy adult volunteers (aged 25 to 30 years) was used in this study. Stool samples were collected, coded, and manipulated anonymously and were used only for this study. As food matrices, five salad and five minced-beef samples were purchased at different dates from local retailers. The samples of beef were freshly minced on request at local supermarkets, and salad samples were a commercially prepared mixture. Five river water samples were collected at different dates in the lower course of the River Llobregat, located in the Barcelona (Spain) area.

Samples were spiked with phages and bacteria as described above. Liquid samples were homogenized by magnetic stirring for 2 min and directly processed. Solid samples were mixed 1:5 (wt/vol) in phosphate-buffered saline (PBS), placed in stomacher bags with filters (Afora, Bar-

celona, Spain), and homogenized using a Masticator (IUL Instruments GmbH, Königswinter, Germany) for 2 min. The samples were then allowed to settle to precipitate the larger particles, and the homogenate was processed. To avoid filter clogging in solid samples, an additional soft centrifugation step (300 \times g for 10 min) was added. The phage reduction procedure (with PVDF filters and three washing steps) was then applied to the samples, and phages and/or bacteria were recovered from the filters as described above. Phages and bacteria were monitored by qPCR as described below, and the results obtained were compared with the values of the controls processed without filtration.

Standard and qPCR procedures. Endpoint PCR amplifications were performed with a GeneAmp PCR 2400 system (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain) with the primers described in Table 1.

Phage 933W quantification. A *stx₂* qPCR assay was used for phage 933W quantification, as previously described (19). Since Stx phages are known to carry only one *stx* copy, the *stx* gene copy (GC) values can be extrapolated to the number of Stx phages in each sample.

Recombinant *E. coli* C600 (933Wgfp) quantification. In the samples spiked with bacteria and phages, and to discriminate bacteria from free Stx phages, recombinant *E. coli* C600 (933Wgfp) was used; to quantify these recombinant bacteria, a TaqMan qPCR assay for the detection of *gfp* was designed using the primers GFPTir-F/GFPTir-R and a minor groove binding probe, GFPTir, with a 5' 6-carboxyfluorescein (FAM) reporter and a nonfluorescent quencher (NFQ). The qPCR assays were performed under standard conditions in a StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems) in a 20- μ l reaction mixture with TaqMan Environmental Real-Time PCR master mix 2.0 (Applied Biosystems). All the samples and standards were run in triplicate, and the GC number was the average of the triplicate data obtained. For the generation of a *gfp* qPCR standard, plasmid pGreen TIR (28) was used and prepared as described previously (19). The assay showed an efficiency of 99.39%.

Statistical analyses. Data and statistical tests were performed using the Statistical Package for Social Science software (SPSS). One-way analysis of variance (ANOVA) with a *P* value of 0.05 was used to evaluate the differences between the DNA extraction methods and between filtered and nonfiltered samples.

RESULTS

Comparison of DNA extraction methods. As expected, phage DNA was extracted from the 933W suspension with similar efficiencies by all the methods used, and quantification of *stx* in the phage DNA did not show any significant (*P* > 0.05) differences between the method designed specifically for phage DNA extraction and the commercial methods intended for total (bacterial and phage) DNA extraction (Fig. 2). These results confirm that common laboratory protocols can indeed include phage DNA in the results when food, environmental, and clinical samples are pro-

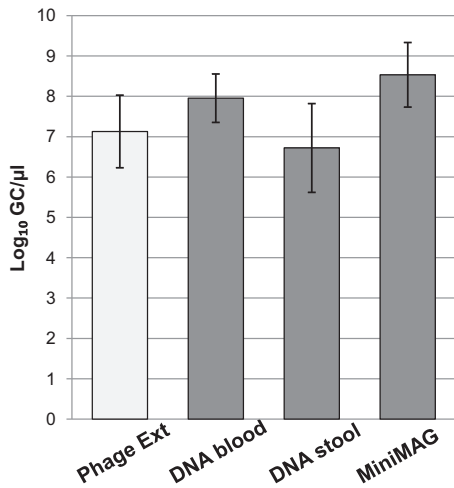


FIG 2 Concentrations of phage 933W evaluated by measurement of numbers of *stx*₂ GC/μl from phage DNA extracted using conventional phage DNA extraction (Phage Ext) methods and commercial DNA extraction kits (QIAamp DNA Blood minikit, QIAamp DNA Stool minikit, and NucliSENS miniMAG).

cessed. The experiments we detail below were performed with a QIAamp DNA Blood minikit, and a single DNA extraction was used to quantify either bacterial or phage DNA.

Phage reduction procedure. To determine whether the filtration step reduced the number of phage in a given sample, phage 933W was spiked in PBS. Samples were filtered through two different membrane filters: a 0.45-μm-pore-size mixed cellulose ester membrane and a 0.45-μm-pore-size PVDF membrane, described as a low-protein-binding membrane. To reduce phage content further, the filtration was followed by one washing step with PBS. After filtration, 933W was recovered from the filter and quantified by qPCR; results were then compared with those from the nonfiltered sample. All the filtration procedures significantly ($P < 0.05$) reduced the number of phage particles in the samples, but the use of low-protein-binding membranes resulted in a better reduction (Fig. 3A) (2.4 log₁₀ GCs/μl) than filtration through mixed cellulose esters (0.8 log₁₀ GCs/μl). Additional washing

steps (three) were applied to the PVDF membrane to achieve a phage reduction of 3.3 log₁₀ GCs/μl after filtration, compared with the initial sample (Fig. 3A). The experiments we describe below were therefore performed with filtration through PVDF membranes and three consecutive washing steps.

Analysis of the filtrate recovered after three washing steps allowed detection of 3.6 (0.13 standard deviation) log₁₀ GCs/μl phage 933W, which is equivalent to the reduction observed by the filtration procedure.

Influence of the procedure on culturable bacteria. The phage reduction procedure did not negatively affect recovery of culturable bacteria, as observed in experiments with PBS samples that were spiked with *E. coli* DH5α or with *E. coli* C600 laboratory lysogen containing phage 933Wgfp (Fig. 3B). This phage-containing lysogen was used to avoid manipulation of a pathogenic STEC strain and also as an STEC surrogate to evaluate an *E. coli* lysogen carrying an Stx phage under conditions as similar to those of an STEC strain as possible. No spontaneous release of the 933Wgfp phage during the cultivation of the strain before spiking the samples was expected due to the antibiotic selection, which allows growth of only the cells containing the phage. The numbers of culturable cells evaluated in LB agar for *E. coli* DH5α or in LB plus Cm for *E. coli* C600 (933Wgfp) at 37°C were not significantly different ($P > 0.05$) before and after the procedure (Fig. 3). Moreover, culturable *E. coli* strains DH5α and lysogen C600 (933Wgfp) (CFU/ml) were absent in the filtrate.

Evaluation of the procedure at different bacterial and phage concentrations. To assess the influence of various densities of Stx phages or culturable bacterial cells in PBS, we evaluated the phage removal protocol at decreasing concentrations (from 10⁵ to 10² CFU/ml) of culturable *E. coli* C600 (933Wgfp) in combination with decreasing concentrations (from 10⁴ to 10¹ GCs/μl) of phage 933W as evaluated by qPCR. DNA extraction was performed for each mixture with and without application of the phage removal procedure (Fig. 4).

As before, differences in numbers of culturable bacteria between the filtered and unfiltered samples were not significant ($P > 0.05$), indicating that the procedure did not interfere with bacterial determination. In contrast, the concentration of 933W fell below the limit of detection in the filtered samples. At the highest

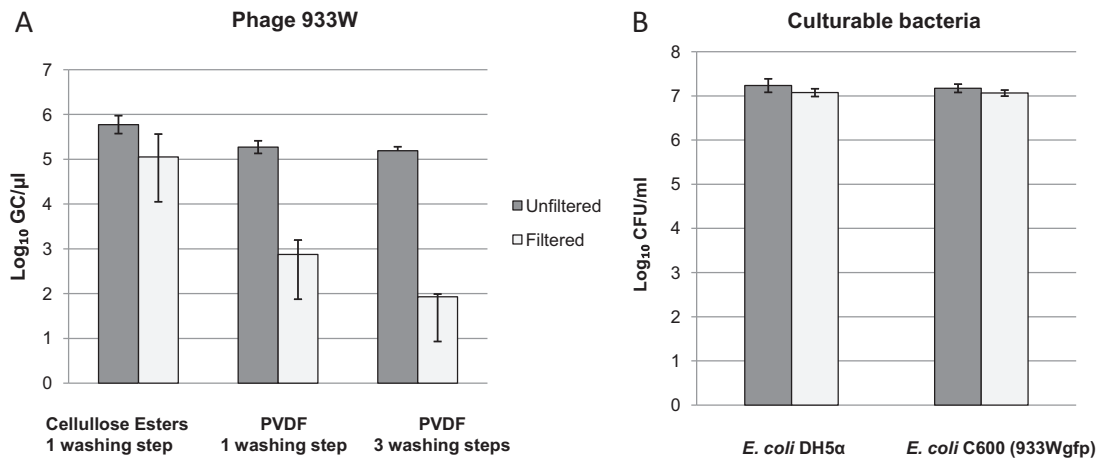


FIG 3 Concentrations of phage 933W (GC/μl) (A) and culturable *E. coli* strains DH5α and lysogen C600 (933Wgfp) (CFU/ml) (B) with or without application of the filtration procedure used to remove bacteriophage.

FILTERED		<i>E. coli</i> C600 (933Wgfp) (\log_{10} CFU/ml)			
		10^5	10^4	10^3	10^2
933W (\log_{10} GC/ μ l)	10^4	5.73 1.25*	4.89 1.31*	3.25 1.58*	2.30 1.66*
	10^3	5.93 ND	4.97 ND	3.28 ND	2.60 ND
	10^2	5.15 ND	4.95 ND	3.04 ND	2.50 0.72*
	10^1	5.05 ND	4.83 ND	3.30 ND	2.30 ND
UNFILTERED					
933W (\log_{10} GC/ μ l)	10^4	5.61 4.37	4.81 4.37	3.10 4.15	2.11 4.30
	10^3	5.45 3.34	4.61 3.18	3.28 3.15	2.00 3.15
	10^2	5.46 2.35	4.72 2.25	3.25 2.02	2.29 2.25
	10^1	5.30 1.76	4.72 1.69	3.20 1.74	2.63 1.60*

FIG 4 Concentrations of phage 933W (GC/ μ l) (dark gray) and culturable *E. coli* lysogenic strain C600 (933Wgfp) (CFU/ml) (light gray) in mixtures containing different phage and bacteria densities with or without the application of the filtration procedure used to remove bacteriophage. *, C_T below the detection limit; ND, not detected.

phage densities (10^5 GCs/ μ l), the phage was still detectable in the filtered samples although the values obtained were below the limit of detection required for positive samples in our qPCR assay, as determined by a threshold cycle (C_T) of <32.0 (19). These results correspond to samples marked with an asterisk in Fig. 4. For the

other dilutions, Stx phages were undetectable by the qPCR assay (C_T of >33.5 or undetermined) (Fig. 4).

Application of the procedure for reduction of Stx phages in food and stool samples. The phage reduction method was applied in different matrices: PBS (control), river water, salad, minced beef, and human feces. The samples were spiked with *E. coli* C600 (933Wgfp) and phage 933W at known densities (approximately 10^5 GCs/ μ l of bacteria or phage). To reproduce the real procedure, bacteria and phages were evaluated from a single DNA extraction and by qPCR (*stx* assay for phages and *gfp* assay for bacteria) (Fig. 1), and values were compared between filtered and unfiltered samples.

Significant ($P < 0.05$) reductions in the number of Stx phages were obtained by the procedure in all the matrices analyzed without any significant ($P > 0.05$) reduction in the densities of *E. coli* C600 (933Wgfp) (Fig. 5). The reduction efficiency varied between the different matrices. Liquid samples showed the best reductions; in solid samples, the procedure required sedimentation of the sample to avoid collapse of the filter membranes, which would reduce the efficacy of the procedure. Sedimentation was conducted by including soft centrifugation ($300 \times g$ for 10 min) that was confirmed not to reduce bacterial counts (Fig. 5).

Salad, meat, and stool samples were also used to evaluate the presence of Stx phages by endpoint PCR using primers UP378/LP378 (32). The samples were directly analyzed or spiked with 10^4 GCs/ μ l of phage 933W suspension, with or without filtration. Nonspiked samples were negatives for *stx*₂. In the spiked samples, only unfiltered samples showed positive *stx*₂ detection, while the filtered ones were negative by endpoint PCR.

DISCUSSION

An important volume of work reports positive detection of *stx* and therefore STEC by PCR or qPCR techniques but then fails to isolate an STEC strain (33, 34). This could be attributed to several causes, such as previous antibiotic treatment of the patient, a dis-

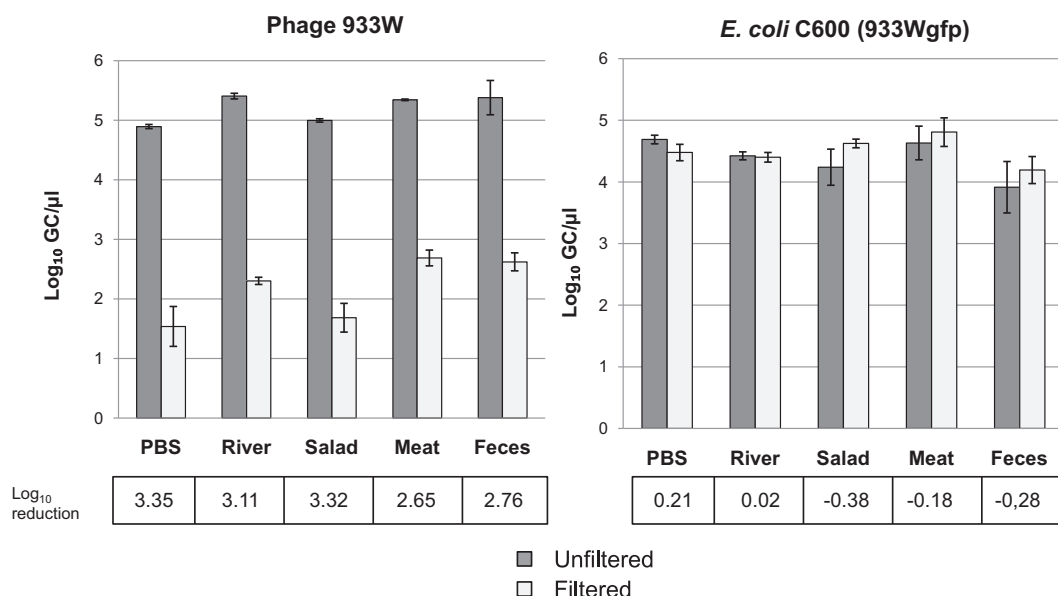


FIG 5 Simultaneous evaluation by qPCR of the densities of 933W and *E. coli* C600 (933Wgfp) in different matrices with and without the application of the filtration procedure.

ease diagnosed late in its course, the presence of commensal *E. coli* and other commensal flora in the sample, even to the presence of viable but nonculturable microorganisms, or just because the target bacteria is present in very low numbers. However, here we present a new consideration: the presence of Stx phages in the samples and their interference in positive PCR detection or their inclusion in sequences generated by NGS. This possibility is very real since it has previously been shown that Stx phages are abundant in many environments, including the human gut (20, 21, 23, 29).

Our study confirms that the methods used for bacterial DNA extraction in these complex matrices (14, 35, 36) also extract phage DNA. While this result was expected, the efficiency of recovery of phage DNA had not been previously evaluated. Therefore, any virulence genes present in phage DNA, particularly *stx* but also other virulence genes described in prophages (e.g., *nle* and *cdt*), could be detected in the sample. When NGS is used, there is no easy way to establish whether the target detected is from bacteria or from a prophage if the contig is not a sequence long enough to contain bacterial DNA. Although it could be argued that detection of *stx* could be considered indicative of the presence of STEC, if it is from a phage, the threat for virulence in humans is much less important, and this should be considered. In terms of diagnosis or food safety analyses, false-positive results could interfere with determination of the real causative agent. Many PCR assays include multiple target genes that could help rule out false STEC detections (5, 7, 36), but, again, there is no confirmation that all genes detected are located in the same bacterial chromosome.

Moreover, from a more practical point of view, enrichment cultures used to selectively isolate bacteria can cause the propagation of any sort of phages present in a sample. Many natural samples carry virulent phages that will propagate during the culture by causing the lysis of the bacteria that is the intended target of the detection; this would cause a bias in the population of enriched bacteria (37). Phage reduction procedures offer the possibility of reducing the numbers of any sort of phages in food or stool samples, enhancing detection and plausibly isolation of the target pathogen.

Complete elimination of all phages present in the samples cannot be accomplished by the procedure presented here, and the fact that phages were still present in the samples after the procedure, even at low concentrations, could represent a problem because enrichment cultures will likely be performed with these samples, allowing phages to multiply. Nevertheless, a compromise can be found between an easy and feasible approach that could be applied in routine laboratories and that does not affect bacterial determination while causing a reasonable reduction on phage populations. In addition, the efficiency of the filtration would always be higher when aqueous samples or clear homogenates of solid samples are treated than when complex solid samples that require additional sedimentation steps are treated. In general, the additional time required to apply the procedure is around 15 min while the cost is negligible (limited only to the membranes), and the procedure requires basic laboratory equipment; the benefits should therefore be evaluated. Although the method has been checked on a laboratory basis using spiked samples, more studies using real STEC-positive samples, analyzed on a routine basis in parallel with or without phage reduction, should be conducted in future studies to validate and optimize this method.

New perspectives for pathogen detection are offered by NGS techniques (22, 38, 39). Regarding the implementation of these techniques for routine diagnosis of pathogens, the interference that phages could cause in the assembly of a genome sequence should be considered when DNA is obtained directly from the samples and not from isolates, particularly from the less abundant members of a microbial community (40). For example, virulence genes (*stx* or others) or antibiotic resistance genes, both reported in phages or phage-like elements (41–43), will certainly be detected, but the strain or species to which they belong, if any, will be unknown. The reduction of possible interferences would improve the efficiency and reliability of genomics when routinely applied.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Merino from the University of Barcelona for providing us with the plasmid pGreen TIR containing the green fluorescence protein.

This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2012-30880) and the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043) and by the Spanish Reference Network of Biotechnology (XeRBA). P.Q. and A.M.-C. received grants from the Spanish Ministry of Education and Science.

REFERENCES

- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11:142–201.
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. 2005. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet 365:1073–1086. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71144-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2).
- Paton JC, Paton AW. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev 11:450–479.
- Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL. 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Clin Infect Dis 43:1587–1595. <http://dx.doi.org/10.1086/509573>.
- Paton JC, Paton AW. 2003. Methods for detection of STEC in humans. An overview. Methods Mol Med 73:9–26.
- Bibbal D, Loukiadis E, Kérouredan M, Peytavin de Garam C, Ferré F, Cartier P, Gay E, Oswald E, Auvray F, Brugère H. 2014. Intimin gene (*eae*) subtype-based real-time PCR strategy for specific detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in cattle feces. Appl Environ Microbiol 80:1177–1184. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03161-13>.
- Kagkli D-M, Weber TP, Van den Bulcke M, Folloni S, Tozzoli R, Morabito S, Ermolli M, Gribaldo L, Van den Eede G. 2011. Application of the modular approach to an in-house validation study of real-time PCR methods for the detection and serogroup determination of verocytotoxinogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 77:6954–6963. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.05357-11>.
- Maurer JJ, Schmidt D, Petrosko P, Sanchez S, Bolton L, Lee MD. 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. Appl Environ Microbiol 65:2954–2960.
- Feng P, Weagant SD, Jinneman K. 2011. Diarrheagenic *Escherichia coli*, chapter 4A. In Bacteriological analytical manual online U. S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>.
- Baquero F, Tobes R. Bloody *coli*: a gene cocktail in *Escherichia coli* O104:H4. mBio 4(1):e00066-13. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00066-13>.
- Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. Mol Cell Probes 18:185–192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2003.12.004>.
- Gould LH, Bopp C, Strockbine N, Atkinson R, Baselski V, Body B, Carey R, Crandall C, Hurd S, Kaplan R, Neill M, Shea S, Somsel P, Tobin-D'Angelo M, Griffin PM, Gerner-Smidt P, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. Recommendations for diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. MMWR Recomm Rep 58(RR-12):1–14.
- Tseng M, Fratamico PM, Bagi L, Delannoy S, Fach P, Manning SD,

- Funk JA. 2014. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) from finishing swine in a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* 80:6395–6402. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01761-14>.
14. International Organization for Standardization. 2012. Microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens: horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. ISO/TS 13136:2012. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
 15. Commission of the European Communities. 2005. Commission regulation (EC) no. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Communities, L 388. Commission of the European Communities, Brussels, Belgium. <http://faolex.fao.org/docs/pdf/eur61603.pdf>.
 16. Underwood AP, Dallman T, Thomson NR, Williams M, Harker K, Perry N, Adak B, Willshaw G, Cheasty T, Green J, Dougan G, Parkhill J, Wain J. 2013. Public health value of next-generation DNA sequencing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates from an outbreak. *J Clin Microbiol* 51:232–237. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01696-12>.
 17. 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, Norfolk, United Kingdom.
 18. Schmidt H, Montag M, Bockemühl J, Heesemann J, Karch H. 1993. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun* 61:534–543.
 19. 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>.
 20. 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. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02162.x>.
 21. 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* 79:4862–4868. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01158-13>.
 22. Loman NJ, Constantinidou C, Christner M, Rohde H, Chan JZ-M, Quick J, Weir JC, Quince C, Smith GP, Betley JR, Aepfelbacher M, Pallen MJ. 2013. A culture-independent sequence-based metagenomics approach to the investigation of an outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA* 309:1502–1510. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.3231>.
 23. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02703-10>.
 24. 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* 65:5615–5618.
 25. Allué-Guardia A, Martínez-Castillo A, Muniesa M. 2014. Persistence of infectious Shiga toxin-encoding bacteriophages after disinfection treatments. *Appl Environ Microbiol* 80:2142–2149. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04006-13>.
 26. Rode TM, Axelsson L, Granum PE, Heir E, Holck A, L'abée-Lund TM. 2011. High stability of Stx2 phage in food and under food-processing conditions. *Appl Environ Microbiol* 77:5336–5341. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00180-11>.
 27. 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>.
 28. Miller WG, Lindow SE. 1997. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* 191:149–153. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00051-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00051-6).
 29. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00107-10>.
 30. 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>.
 31. 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>.
 32. 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.
 33. 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* 4:46. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2014.00046>.
 34. Urdahl AM, Solheim HT, Vold L, Hasseltvedt V, Wasteson Y. 2013. Shiga toxin-encoding genes (*stx* genes) in human faecal samples. *APMIS* 121:202–210. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02957.x>.
 35. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02013-08>.
 36. Monday SR, Beisaw A, Feng PCH. 2007. Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Mol Cell Probes* 21:308–311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2007.02.002>.
 37. Muniesa M, Blanch AR, Lucena F, Jofre J. 2005. Bacteriophages may bias outcome of bacterial enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* 71:4269–4275. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.8.4269-4275.2005>.
 38. Fricke WF, Rasko DA. 2014. Bacterial genome sequencing in the clinic: bioinformatic challenges and solutions. *Nat Rev Genet* 15:49–55. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3624>.
 39. Bertelli C, Greub G. 2013. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 19:803–813. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12217>.
 40. Relman DA. 2013. Metagenomics, infectious disease diagnostics, and outbreak investigations: sequence first, ask questions later? *JAMA* 309:1531–1532. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.3678>.
 41. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004>.
 42. Novick RP, Christie GE, Penadés JR. 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8:541–551. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2393>.
 43. 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* 58:606–609. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01684-13>.



5. DISCUSIÓN GENERAL

Tanto los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) como algunos genes de virulencia son movilizados entre las poblaciones bacterianas por elementos genéticos móviles (MGE). Estos elementos pueden proporcionar a las bacterias una amplia variedad de genes a su alcance, facilitando así su adaptación al medio y su capacidad de evolución. En esta tesis hemos estudiado concretamente el papel de los bacteriófagos (y/o partículas fágicas) en la transferencia horizontal de genes (HGT).

En relación con otros mecanismos de HGT, como la transformación, la conjugación y los transposones, existen MGE en los que se observan formas intermedias de estos elementos; así existen fagos que replican como plásmidos (Oliver *et al.*, 2005), transposones insertos en fagos (Willi K1, Sandmeier H, Kulik EM, 1997) o fagos que se movilizan como un transposón (fago Mu) (Mizuuchi, 1983). Hay fagos que movilizan secuencias del cromosoma bacteriano, como las islas de patogenicidad (Quiles-Puchalt *et al.*, 2014; Penadés *et al.*, 2015). No se descarta que existan otros elementos intermedios además de los ya descritos (García-Aljaro *et al.*, 2017).

El hecho de que los fagos puedan movilizar también el ADN bacteriano significa que pueden movilizar y transducir genes de virulencia (O'Brien *et al.*, 1984; Allué-Guardia *et al.*, 2011; Penadés *et al.*, 2015), genes de resistencia a antibióticos (Maite Muniesa *et al.*, 2004; Colomer-Lluch, Jofre, *et al.*, 2011; Haaber *et al.*, 2016) o genes relacionados con la mejor adaptación al medio (Lindell *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2013). Aunque anteriormente se pensó que la transducción de ADN bacteriano era la consecuencia de errores en la maquinaria de empaquetado del fago y, por lo tanto, un evento raro que ocurría aproximadamente una vez cada 10^7 - 10^9 infecciones, los datos recientes sugieren que la tasa de transducción se podría haber subestimado (Stanczak-Mrozek *et al.*, 2017).

La HGT mediada por bacteriófagos tiene algunos rasgos únicos. Como desventajas, la transducción ocurre a tasas relativamente bajas y habitualmente involucra pocos genes cromosómicos, lo que puede restringir su capacidad para transferir rasgos complejos que requieren la transferencia conjunta de varios genes. Además, la transducción especializada y la lisogenia pueden provocar la muerte del huésped en caso de activación del ciclo lítico. Por el lado positivo, la transferencia de genes mediada por fagos no requiere el contacto directo de célula a célula (al contrario que la conjugación), y puede transferir ADN en diversos ambientes (a diferencia de la transformación) (Touchon *et al.*, 2017). Dada la especificidad de algunos fagos por ciertos grupos bacterianos, se produciría transferencia del ADN sólo entre determinadas poblaciones bacterianas. Los fagos también pueden sobrevivir en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo, lo que permitiría la transferencia de información genética tiempo después de que la bacteria donadora de esos genes haya muerto. Por estos factores, los fagos serían los movilizadores de genes más eficientes en el tiempo y en el espacio.

Además, no solo los fagos atemperados son capaces de movilizar genes entre las poblaciones bacterianas, en ocasiones los fagos virulentos también son capaces de movilizar genes bacterianos por transducción generalizada (Ripp *et al.*, 1994; Petty *et al.*, 2007) y otros mecanismos que aún no

se conocen con exactitud (Stanton, 2007). En este tipo de movilidad genética, como ya hemos visto en la introducción, diferentes partes del ADN bacteriano pueden ser movilizadas pero aún no está claro si el ADN es empaquetado al azar, o bien existe cierta predeterminación hacia los genes que puedan conferir a la bacteria huésped alguna ventaja adaptativa, como podrían ser los genes de virulencia y los ARGs (Brown-Jaque *et al.*, 2015b; Penadés *et al.*, 2015; Haaber *et al.*, 2016).

Los datos obtenidos en estudios de metagenómica sugieren que la transducción generalizada puede contribuir significativamente a la HGT en procariotas, pero todavía faltan datos cuantitativos sobre este proceso. Existen enormes cantidades de ADN bacteriano que se ha localizado en diversos viromas (Colomer-Lluch, Jofre, *et al.*, 2011; Haaber *et al.*, 2016; Brown-Jaque *et al.*, 2017; Lekunberri *et al.*, 2017). El desconocimiento también es importante con respecto a la importancia de la contribución de la transducción especializada. Actualmente la relevancia de la lisogenia en la HGT está bien establecida, pero se necesitan nuevos estudios y enfoques para cuantificar la influencia de la transducción en la evolución genética de las poblaciones bacterianas (Touchon *et al.*, 2017).

Algunos géneros bacterianos pueden producir elementos similares a los fagos usando información codificada en su propio genoma. Estas “partículas fágicas”, llamadas “agentes de transferencia génica” (**GTA**), tienen una cápside de tipo bacteriófago y, aunque hasta el momento se han descrito en pocos grupos como las α -proteobacteria (Zhao *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2012), es razonable pensar que este mecanismo o alguno similar, está presente en otros grupos bacterianos. 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).

De hecho, muchos de los genomas bacterianos secuenciados hasta la fecha incluyen varias secuencias de profago. Muchos de ellos han sido descritos como profagos no funcionales, defectivos o vestigios de antiguos fagos. Dentro de éstos, se han identificado sobre todo los genes de la cápside (Asadulghani *et al.*, 2009; Fortier and Sekulovic, 2013). La cuestión de por qué estas secuencias remanentes prevalecen en el cromosoma bacteriano si la información contenida es incompleta y por tanto no es útil, es verdaderamente intrigante; las células bacterianas tienden a eliminar cualquier información que no sea estrictamente beneficiosa para su adaptación (Nilsson *et al.*, 2005). A menos que en algunas ocasiones estos llamados “vestigios de fagos antiguos” sean en realidad elementos similares a GTAs.

La diferencia más importante entre los GTAs y la transducción generalizada radica en que no es necesaria la infección previa de un fago virulento para que suceda, puesto que la información de los GTAs ya está presente en la célula donadora. Es importante destacar que los GTAs en lugar de transportar ADN que codifique su propia replicación, como ocurre con los bacteriófagos auto-propagadores (fagos Stx por ejemplo), sólo contienen fragmentos del genoma de la célula donadora (Marrs, 1974; Humphrey *et al.*, 1997; Stanton, 2007). La causa se atribuye al hecho de que los genes de los GTAs están demasiado “ocupados” transcribiéndose como para replicarse y por tanto son empaquetados a muy baja frecuencia (Lang and Beatty, 2001; Lang *et al.*, 2012). Como consecuencia los GTAs pueden transferir información del genoma bacteriano, pero son incapaces de auto-propagarse (Lang and Beatty, 2000, 2001, 2007). Además, la producción de GTAs está controlada

por mecanismos de regulación celular (Lang and Beatty, 2000; Leung *et al.*, 2012; Mercer *et al.*, 2012; Brimacombe *et al.*, 2014) y aunque las partículas de GTAs se liberan a través de la lisis celular (Hynes *et al.*, 2012; Westbye *et al.*, 2013), los cultivos no muestran lisis observable (Marrs, 1974) ya que solo una pequeña subpoblación del cultivo son productores de GTA (~ 3 %), siendo éstas responsables del 95% de la liberación de GTAs (Fogg *et al.*, 2012; Hynes *et al.*, 2012). Asimismo, el sistema de defensa bacteriano CRIPR-Cas de la bacteria receptora, suele tener como diana el ADN fágico, por lo que debería ser más permisivo con la transducción de ADN bacteriano por medio de GTAs que con la transducción de genes propiamente fágicos.

Junto con la conjugación, la HGT por GTAs podría ser una de las principales vías de diseminación de resistencias a antibióticos entre las poblaciones bacterianas. Un estudio reciente ha informado que los bacteriófagos (entendidos como partículas de fago completas que contienen ADN de fago y son capaces de propagar) rara vez codifican ARGs (Enault *et al.*, 2017), lo que apoya la hipótesis que es realmente el ADN bacteriano el que se empaqueta en partículas fágicas o GTAs y explica el porqué del elevado número de partículas fágicas portadoras de ARGs que detectamos en nuestros estudios, en contraste con las relativamente pocas descripciones de fagos auto-propagativos que codifican ARGs.

Varios estudios han detectado ARGs en el ADN fágico (o viral) de muestras procedentes de ambientes tales como lodos de depuradora (Parsley *et al.*, 2010; Calero-Cáceres *et al.*, 2014), agua residual urbana y agua de río (Colomer-Lluch, Jofre, *et al.*, 2011), en aguas residuales de hospitales y plantas depuradoras (Colomer-Lluch *et al.*, 2014; Marti *et al.*, 2014) y en suelos agrícolas fertilizados con abonos naturales (Ross and Topp, 2015). En el capítulo de este trabajo llamado **“Genes de resistencia a antibióticos en el ADN de bacteriófagos en muestras fecales”** se analizaron muestras fecales de 80 individuos que no presentaban ninguna patología intestinal y no habían consumido antibióticos recientemente. Se comparó el ADN total con el ADN viral la presencia y abundancia de seis ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *armA*, *qnrA*, *qnrS* y *mecA*).

Los resultados mostraron que los genes de resistencia a antibióticos β-lactámicos, *bla*_{CTX-M-1} y sobretodo *bla*_{TEM}, y el gen de resistencia a quinolonas *qnrA*, fueron los más prevalentes de manera general, tanto en el ADN total como en el ADN viral, coincidiendo con los resultados de otras publicaciones (Cantón and Coque, 2006; Robicsek *et al.*, 2006; Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Colomer-Lluch, Jofre, *et al.*, 2011). El gen *mecA*, pese a ser considerado de gran relevancia al conferir resistencia a la metilina a *Staphylococcus spp.*, causantes de brotes epidémicos e infecciones nosocomiales (*Staphylococcus aureus* especialmente) (Deurenberg and Stobberingh, 2008), no fue nada frecuente en este estudio. Quizás porque *Staphylococcus spp.* no es una bacteria que se encuentre habitualmente en el tracto intestinal, sino que suele estar presente en la piel, las mucosas y el tracto respiratorio humano.

Lo que realmente sorprendió fue la alta prevalencia de ARGs en el ADN fágico o viral, mostrando claramente que las partículas fágicas (o quizás como creemos partículas del tipo GTAs) pueden desempeñar un papel importante en la diseminación de este tipo de genes. Además, en los diferentes tipos de ambiente donde se habían encontrado ARGs, citados anteriormente, se demostró la existencia de genes de resistencia dentro de partículas fágicas en el medio, pero

quedaba la duda de si estas partículas estaban ahí por su propia propagación en el medio ambiente, o bien podría existir la posibilidad de que proviniesen directamente excretados en las heces. En este trabajo quedó demostrado que junto con las heces de individuos sanos se excretan al medio partículas fágicas que codifican diferentes tipos de ARGs. Resultados que se ven apoyados por varios estudios que confirman el papel de la microbiota intestinal como un reservorio importante de ARGs (Salyers *et al.*, 2004; Sommer *et al.*, 2009) y respalda la teoría de que la mayoría de ARGs se movilizan en partículas fágicas, quizás similares a los GTAs en lugar de moverse en bacteriófagos “auto-propagables”.

Además de moverse, existen ejemplos de resistencias a antibióticos que pueden transferirse de unas especies animales a otras por medio de transducción. Bacteriófagos aislados de las heces de ratón tratadas con antibióticos puede conferir resistencia a antibióticos a la microbiota intestinal murina (Modi *et al.*, 2013). Sin embargo, los estudios de Modi *et al.* podrían verse sesgados por la elevada concentración de antibióticos con que se trató a los ratones, forzando a un cambio de flora a flora resistente, lo que podría haber incrementado mucho la fracción de partículas portadoras de ARGs y por tanto la frecuencia de transducción.

Una de las principales causas de diseminación de antibióticos al medio, son los antibióticos añadidos en la alimentación animal, habiendo ya demostrado (Allen *et al.*, 2011) que estos antibióticos suministrados en la comida de cerdos, inducen profagos en los microbiomas fecales porcinos. La transferencia horizontal de genes (incluida la transducción) está sujeta a presión selectiva (Perry and Wright, 2014). Parece probable que el uso de antibióticos y otros antimicrobianos aumente la presión selectiva sobre las bacterias que portan ARGs y los vectores que movilizan estos genes. Por tanto, es tentador especular que la transducción generalmente se potencia con la existencia de esta presión selectiva que generan los antibióticos en el medio. Dado que el uso de antibióticos es muy común en veterinaria y en medicina, así como lo ha sido su utilización en granjas de animales y en algunos casos en alimentos. El contacto con estas sustancias podría provocar la inducción de las partículas fágicas portadoras de genes de resistencia u otros tipos de genes de virulencia y su liberación al medio. Esta presión selectiva también se ha descrito en otros MGE como los plásmidos. Por ejemplo, el análisis de bacterias patógenas aisladas en la era “preantibiótica”, demostró que los plásmidos que estas llevaban en su interior eran muy similares a los plásmidos existentes en patógenos actuales, pero estaban libres de ARGs (Hughes and Datta, 1983; Pal *et al.*, 2016). Es por tanto fácil suponer que el motivo de esta adquisición global de ARGs por parte de bacterias patógenas (y no patógenas) sea esta presión selectiva a la que el ser humano está sometiendo a las poblaciones bacterianas.

En cuanto a la HGT por medio de bacteriófagos (auto-propagadores), en este trabajo nos hemos centrado en el estudio del gen de virulencia *stx* y su fago portador; el fago Stx. En las STEC, este fago se encuentra integrado en el ADN cromosómico en forma de profago. El riesgo de desarrollar HUS después de una infección por STEC depende de varios factores, tanto del huésped humano como del patógeno, que incluyen en el caso del huésped: la demografía (Gould, Demma, *et al.*, 2009), la inmunidad (Karmali *et al.*, 2003), el estilo de vida (Heiman *et al.*, 2015) y el uso de agentes antimicrobianos (Tarr *et al.*, 2005); y en caso del patógeno estos factores serían: el serotipo de la cepa (Nataro and Kaper, 1998; Karmali *et al.*, 2010), el tipo de toxina Stx (Melton-Celsa, 2014), otros

factores de virulencia como LEE (Nataro and Kaper, 1998) y la dosis de exposición (Delignette-Muller *et al.*, 2008).

Estos fagos Stx también se encuentran en forma de vida libre por el ambiente, y están ampliamente distribuidos por todo el mundo, siendo capaces de transmitir el gen que codifica la toxina Shiga mediante la conversión lisogénica y transducción de *stx* entre sus potenciales huéspedes bacterianos, siendo generalmente *E. coli* (Schmidt *et al.*, 1999; James *et al.*, 2001; M. Muniesa *et al.*, 2004; Cornick *et al.*, 2006).

En el capítulo **“Los bacteriófagos libres que codifican para la toxina Shiga 1 son menos frecuentes que los bacteriófagos de la toxina Shiga 2 en ambientes extraintestinales”**, nos propusimos arrojar un poco de luz sobre los fagos Stx1, mucho menos estudiados que los fagos Stx2. Para ello, en primer lugar para poder detectar la presencia y cantidad de fagos Stx1 libres en 357 muestras de diferentes ambientes extraintestinales, diseñamos una nueva PCR cuantitativa (qPCR) específica para todas las variantes conocidas del gen *stx1* (a, c y d). Logrando, tras testarla correctamente con diversas cepas *stx*, una eficiencia del 98,6% y un límite de detección de 8,1 CG μl^{-1} . Antes de analizar las muestras y contrastar los resultados de Stx1 con los de Stx2, quisimos comparar, utilizando las inducciones de tres cepas *stx1+*, los resultados en CG ml^{-1} de la qPCR con la cantidad de fagos Stx1 observados por microscopía electrónica de transición usando esferas de látex con una concentración conocida para poder cuantificarlos (Crocker and Bennett, 1952; Imamovic, Serra-Moreno, *et al.*, 2010) y con los valores de infectividad en placas de lisis generadas usando *E. coli* WG5 como cepa huésped. El número de bacteriófagos obtenido por el recuento en microscopía fue algo superior al obtenido por qPCR, al igual que en estudios previos (Imamovic, Serra-Moreno, *et al.*, 2010). Esto puede deberse a que la microscopía electrónica permite la visualización de partículas de fago vacías o defectuosas que no llevan ADN en su interior, y por lo tanto no serán cuantificadas por la qPCR. Es por esto que el recuento directo por microscopía no es demasiado fiable, y el ensayo de infectividad es demasiado dependiente de la cepa huésped y de las capacidades líticas del fago. En concreto los fagos Stx son fagos atemperados que tienden a la lisogenia cuando infectan una bacteria. Por tanto, la qPCR mostró ser la técnica más útil para el contaje de fagos Stx1, ya que, por las descripciones hasta el momento, los bacteriófagos Stx1 solo llevan dentro de su cápside una copia del gen y se puede extrapolar que cada copia de *stx* es un fago Stx.

En cuanto al análisis de las 357 muestras ambientales, fue sorprendente la escasa presencia de fagos Stx1, tan solo en un 7,6 % de ellas. Resaltando que las muestras positivas se concentraron mayoritariamente en agua residual de aves de corral, lo que podría relacionarse con la alta incidencia de Stx1 en *E. coli* patógenas de aves (Parreira and Gyles, 2002; Murinda *et al.*, 2004), y en menor medida en agua de río tras episodios de lluvias, momentos en los cuales una parte de los sedimentos del río podrían resuspenderse (Fries *et al.*, 2008).

Respecto a la comparación entre ambos tipos de fagos Stx, los resultados de fagos Stx1 obtenidos en este estudio, fueron comparados con resultados para Stx2 obtenidos previamente por nuestro grupo en las mismas muestras (Imamovic, Balleste, *et al.*, 2010; Imamovic and Muniesa, 2011; Martinez-Castillo *et al.*, 2013). La presencia de Stx1 en el 7,6 % de las muestras contrasta con la presencia de fagos Stx2 en el 68,4 % de las mismas. No se puede descartar que parte de las

partículas de nuestros estudios portadoras de *stx* puedan ser también de tipo GTA (recordemos que todos los genes son susceptibles de ser transferidos de este modo), en particular los fagos Stx2, que son tan abundantes. Sin embargo, dado que los fagos Stx tanto Stx1 como Stx2 están bien descritos, asumiremos que una parte importante de los detectados corresponde a fagos Stx auto-propagadores.

Asumiendo que los fagos detectados sean fagos con su genoma completo, la gran diferencia en la abundancia de ambos tipos de fagos podría explicarse porque aunque los fagos Stx1 y Stx2 poseen muchas características similares, también presentan importantes diferencias. Una de las principales diferencias radica en el promotor que permite la expresión de la toxina Shiga. Los fagos Stx2 sólo tienen un promotor para la *Stx*, que en realidad actúa activando el ciclo lítico del fago, y que permite además expresar los genes *stx*. Sin embargo, los fagos Stx1 tienen dos promotores, uno que activa el ciclo lítico del fago y uno específico aguas arriba del operón *stx1*. Efectivamente, la expresión de genes de virulencia adquiridos puede estar regulada por factores codificados dentro del elemento móvil en sí, por factores codificados por el cromosoma bacteriano, o ambos. Stx1 proporciona un ejemplo de un factor de virulencia cuya producción está regulada tanto por el ciclo de vida del fago codificador como por el elemento móvil. La producción de la toxina Stx1 se ve afectada por el hierro (Calderwood and Mekalanos, 1987; De Grandis *et al.*, 1987), pero no la de la Stx2. El regulador Fur sensible al hierro está codificado en el cromosoma de *E. coli* (Wagner *et al.*, 2002). El promotor de Stx1 posee un lugar de unión para la proteína Fur, con un sitio de unión al hierro. En presencia de hierro, Fur se une al ADN y bloquea la transcripción de *stx1*. En ausencia de hierro, e independientemente de la presencia en el medio de algún agente inductor del fago como la mitomicina C (Ritchie *et al.*, 2003; Steyert *et al.*, 2012) y por tanto independientemente de la inducción del fago Stx1, se expresa el gen Stx1 por medio del promotor Fur-dependiente y se produce toxina Stx. Al no haber inducción del fago y por tanto no haber lisis bacteriana, Stx1 suele encontrarse en la fracción periplasmática de las células y no en el sobrenadante de los cultivos (Shimizu *et al.*, 2007) y la acumulación de Stx1 será intracelular y no extracelular. En este caso, la toxina podría salir de la bacteria por varios mecanismos. Por ejemplo, existen genes similares a los que codifican el sistema de secreción de tipo II que están presentes en un plásmido encontrado en muchas cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Makino *et al.*, 1998), y es posible que dicho sistema contribuya a la liberación de la toxina Stx1. Otra posibilidad es que la destrucción de células bacterianas por el sistema inmune conduzca a la liberación de Stx1 en ausencia de lisis mediada por fagos (Wagner *et al.*, 2002). Además del promotor Fur-dependiente, la toxina Stx1 puede también ser expresada indirectamente por el promotor que regula la inducción del fago. En este caso sí se produce inducción del fago, aumenta en presencia de agentes inductores y la Stx1 es liberada por la lisis causada por el fago.

Por el contrario la expresión de Stx2 depende únicamente del promotor asociado a la inducción del fago. Por tanto es altamente dependiente de agentes inductores y sólo se expresa tras la inducción del fago y requiere necesariamente que ocurra la lisis bacteriana para salir de la célula. Esto obliga a las cepas STEC de Stx2 a activar el fago Stx para expresar la toxina, cosa que no es estrictamente necesaria en las STEC con Stx1.

La expresión de Stx en STEC es una ventaja adaptativa en defensa contra protozoos en su reservorio natural en el tracto digestivo de los rumiantes (Meltz Steinberg and Levin, 2007; Arnold and Koudelka, 2014), esta presión selectiva debería de haber favorecido cepas portadoras de Stx2 inducibles ante un estrés ambiental. De otro modo no producirán Stx2 y no se librarán de la depredación por los protozoos.

Como consecuencia de todo esto, hay mucha más producción de fagos Stx2 que de fagos Stx1, lo que daría una explicación plausible al mayor número de fagos Stx2 detectados en el ambiente. La baja presencia de fagos Stx1 en las muestras analizadas implicaría también una menor frecuencia esperada de transducción de *stx*₁. Por el contrario, debido a la abundancia de fagos Stx2, también sus tasas de transducción deberían ser mucho más elevadas, haciendo mucho más probable la aparición de nuevas cepas productoras de Stx2. Evolutivamente, es tentador sugerir que los fagos Stx2 han evolucionado a partir de los fagos Stx1, adquiriendo mecanismos para lograr una propagación más exitosa, lo que contribuiría a mayores niveles en la expresión de Stx2 y por tanto a la aparición de nuevas cepas Stx2+ virulentas y capaces de provocar HUS.

Es interesante mencionar como ejemplo 2 de los nuevos patógenos híbridos emergentes *stx*₂₊, *E. coli* O104:H4 del brote de Alemania y Francia en 2011 y *E. coli* O80:H2 (Soysal *et al.*, 2016). Ésta última fue una cepa híbrida *stx*₂₊ que se aisló por primera vez en 2005 en Francia, y donde, en 2014, fue la segunda causa de HUS pediátrico después de STEC O157:H7. De 54 pacientes identificados entre 2005 y 2014, alrededor del 90% tenían HUS. Estas cepas exhibieron combinaciones variables de los genes *stx*_{2a}, *stx*_{2c} y *stx*_{2d}. Ambos patógenos híbridos emergentes, adquirieron fagos *stx*₂, en lugar de fagos *stx*₁, por transferencia horizontal. Esto no es sorprendente, ya que como hemos visto los fagos *stx*₂ superan ampliamente en número a los fagos *stx*₁ en los diferentes ambientes.

Una vez vista la gran abundancia de Stx2 en el medio, y sabiendo que, en humanos, Stx2 es más dañina que Stx1 y está más asociada a la aparición de HUS (Boerlin *et al.*, 1999), el riesgo de que se produzcan posibles transducciones y la generación de nuevas STEC, no puede ser ignorado. Por este motivo, en el siguiente trabajo llamado **“Contribución de la tierra de cultivo a la propagación de fagos de la toxina Shiga y la emergencia de nuevas cepas productoras de toxina Shiga”** nos centramos en estudiar la presencia, abundancia, y capacidad de propagación de los fagos Stx en muestras de vegetales y tierra de cultivo. Así como la persistencia, y capacidad de generar nuevas cepas transductantes del fago 933W (Stx2) en el mismo tipo de muestras.

Este estudio se centró en vegetales consumidos habitualmente y en tierra de campos agrícolas, ya que en la actualidad el aumento en el consumo de productos frescos, debido a una mayor concienciación de la sociedad en los beneficios de ingerir verduras (Harris, 2003), sumado a que el alto ritmo de vida y el poco tiempo libre empuja a la sociedad a consumir cada vez más frecuentemente productos vegetales poco tratados o cocinados, listos para el consumo, así como productos exóticos y fuera de temporada (Everis, 2004). Esto supone un riesgo real para las personas. De hecho, se ha descrito en otros trabajos el aumento de enfermedades y brotes epidémicos en los últimos años, relacionado con esta tendencia hacia la “comida sana” (Franz and van Bruggen, 2008; Sharapov *et al.*, 2016; Mikhail *et al.*, 2017). Es más, el consumo de verduras de

hoja verde fue la segunda fuente más común, después de la carne de vaca, de brotes infecciosos transmitidos por alimentos en los Estados Unidos (2003-2012) (Karmali, 2017).

Al mismo tiempo, algunos patógenos como *E. coli* O157:H7 o *Salmonella entérica* tienen la capacidad de colonizar tanto el exterior como el interior de las plántulas de lechuga y tomate cultivadas en suelos fertilizados con abonos contaminados, por lo que en estos casos ni siquiera con un buen lavado podríamos eliminar estos patógenos (Solomon *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2007; Franz and van Bruggen, 2008).

En muchos países en vías de desarrollo el riego de verduras con aguas contaminadas fecalmente es una práctica común (Seidu *et al.*, 2015), lo que causa un elevado riesgo de contaminación del vegetal. Un patógeno frecuente en el agua residual de animales de granja es *E. coli* O157: H7, que puede sobrevivir durante un largo periodo de tiempo en suelos modificados con estiércol (Kudva *et al.*, 1998; Gagliardi and Karns, 2000; Islam *et al.*, 2004) e incluso más tiempo en la estación húmeda cuando el suelo está mojado (Solomon *et al.*, 2002). Islam *et al.* (2004) demostraron que *E. coli* O157: H7 en el abono podría sobrevivir durante más de 5 meses después de la aplicación al suelo; y podrían contaminar con facilidad las hojas de verduras de crecimiento bajo como la lechuga en caso de lluvia a través de las salpicaduras del suelo.

En el caso de las STEC, es de gran importancia analizar la presencia y abundancia, persistencia y capacidad de transducción de los fagos Stx en las muestras de suelo agrícola, ya que estos fagos son los encargados de movilizar el gen de la toxina Stx entre las poblaciones bacterianas, pudiendo generar nuevas STEC. Esto es especialmente importante si se tiene en cuenta que estos suelos son abonados habitualmente con estiércol, lodos tratados o aguas con contaminación fecal (Bradford, 2013). Volviendo a nuestro estudio, en cuanto a la persistencia, los resultados mostraron reducciones tanto a 23 como a 4°C (dos temperaturas comunes de almacenamiento de verduras) de las STEC y de los fagos Stx2, pero ambos permanecen cultivables o infecciosos durante al menos 10 días. Se observó una mínima reducción de las bacterias a 23°C durante los 10 días, lo que pudiera deberse probablemente a un recrecimiento de la bacteria en el vegetal que compensara las muertes, lo que demostraría que las STEC permanecen metabólicamente activas en la tierra y los vegetales a temperatura ambiente.

En cuanto a la presencia y abundancia de fagos Stx de vida libre en las muestras, aparecieron en todos los tipos de vegetales y en la tierra de cultivo. En particular los fagos Stx2, lo que concuerda con nuestro estudio anterior, y cuya presencia en varios ambientes ha sido descrita en nuestro grupo con anterioridad (Muniesa and Jofre, 1998; Imamovic, Balleste, *et al.*, 2010; Imamovic and Muniesa, 2011). Otra observación remarcable fue que gran parte de los fagos Stx que estaban presentes en las muestras de manera natural, eran capaces de propagar en los propios vegetales siempre y cuando dispusieran de una bacteria huésped apropiada, como *E. coli* WG5 en el caso de nuestro trabajo. Además de esto, se consiguió la transducción del gen *stx2* (proveniente del fago 933W) en la tierra y todos los tipos de vegetales con unos valores que van desde casi 10^2 ufc g⁻¹ en lechuga y suelo, pasando por 10^2 y 10^3 ufc g⁻¹ para brotes de lenteja y espinacas respectivamente, hasta casi 10^5 ufc g⁻¹ en pepino, coincidiendo con los resultados de estudios previos en suelo (Nyambe *et al.*, 2016).

Para este experimento utilizamos una bacteria huésped diferente a la usada para el ensayo de propagación, la *Shigella sonnei* 866, lo que confirma un cierto abanico en el rango de huésped por parte de algunos fagos Stx. Esta observación está en concordancia con un estudio previo sobre la transducción de un fago stx2 resistente a cloranfenicol en el que las cepas pertenecientes a todos los grupos diarreogénicos de *E. coli* se infectaron con éxito y produjeron lisógenos estables (Schmidt *et al.*, 1999). En nuestro caso fueron capaces de infectar incluso a bacterias similares pero de géneros distintos como son *Escherichia* y *Shigella*, lo que coincide con lo publicado en otros estudios (García-Aljaro *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2016). Es necesario seguir trabajando para aclarar los mecanismos que conducen a la selección de los fagos Stx capaces de infectar diferentes grupos de enterobacterias.

Puesto que todas nuestras matrices vegetales (lechuga, brotes, pepino y espinacas) se consumen habitualmente crudas, el discreto número de transductantes generados serían suficientes para causar serios problemas de salud pública.

La necesidad de reducir las enfermedades transmitidas por los alimentos requiere el desarrollo de nuevos enfoques para controlar a los agentes responsables. El potencial para usar bacteriófagos líticos en el control de patógenos bacterianos presentes en los alimentos ha sido objeto de estudio (Mahony *et al.*, 2011; Spricigo *et al.*, 2013; Cortés *et al.*, 2018). Los fagos pueden tener propiedades atractivas para este propósito, ya que suelen tener una alta especificidad de huésped, solo se replican en presencia de su huésped bacteriano, por lo que su número aumentaría (y, por lo tanto, el potencial de control biológico), y como ya hemos visto son comunes en el ambiente y están presentes en muchos alimentos de manera natural. Se consideran por tanto organismos no perjudiciales y se propone su uso para eliminar patógenos bacterianos. Sin embargo, pese a que todo esto es cierto, esta estrategia puede ser un arma de doble filo. La problemática de que al propagar puedan actuar como vehículos para la movilización de genes por transducción generalizada o mecanismos similares no debe ser ignorada.

Tras analizar numerosos estudios de detección y aislamiento de STEC, nos dimos cuenta de que existe una problemática causada por la elevada presencia de fagos libres en alimentos listos para el consumo. Si bien las regulaciones actuales tienen en cuenta los riesgos asociados a patógenos bacterianos y virales, se presta escasa o nula atención a la presencia de bacteriófagos, lo que puede comprometer la seguridad de los productos frescos. En las normativas actuales para controles de calidad de alimentos, no encontramos ningún sistema específico para detectar bacteriófagos de vida libre, y como ya hemos visto, esto podría ser un riesgo debido a las posibles transducciones que pueden realizar estos fagos en el propio alimento o bien luego dentro de nuestro intestino, movilizandando genes de resistencias a antibióticos o genes de virulencia entre bacterias susceptibles, y transformando simples microorganismos comensales en patógenos potenciales, o peor aún, transformando cepas con potencial patogénico en cepas hiper-virulentas. Este es el caso del brote de Alemania y Francia en 2010, en que la hipótesis más aceptada es que la cepa causante del brote fue una *E. coli* O104:H4 enteroagregativa que adquirió por transducción el gen que codifica la toxina Shiga de un fago Stx2 libre en el medio. Esta cepa por tanto, además de poseer los genes de virulencia responsables de la típica adhesión bacteriana de las EAggEC, también obtuvo la capacidad

de producir la toxina Shiga (Bielaszewska *et al.*, 2011), resultando en una cepa extremadamente virulenta (Buchholz *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2011; Muniesa *et al.*, 2012).

Asimismo, no hay que olvidar, que la lisogenización doble (o incluso triple) de una bacteria susceptible, por el fago Stx y algún otro tipo de fago, o por varios fagos Stx es un fenómeno bastante común, como se demostró en algún estudio previo de nuestro grupo (Serra-Moreno *et al.*, 2007). En clínica, por ejemplo, se han descrito muchas cepas STEC que además de poseer el gen *stx*, han resultado también positivas para el gen que codifica la "Cytolethal Distending Toxin" (Bielaszewska *et al.*, 2004, 2009; Friedrich *et al.*, 2006). Este gen *cdt*, al igual que *stx*, es un gen de virulencia movilizado por un bacteriófago, el fago Cdt. Parece claro que la lisogenia múltiple por incorporación de diversos fagos portadores de genes de virulencia, es común en *E. coli* patogénicas, permitiendo a estas cepas incrementar su arsenal de genes de patogenicidad. La coinfección por dos fagos o la infección por un fago de una cepa que ya contiene algún otro, sin duda tiene un papel importante en la evolución tanto de los fagos como de las cepas (Hendrix *et al.*, 1999).

Paradójicamente, en el caso de los fagos Stx, en ocasiones son detectados por error cuando en realidad solo se pretende detectar la presencia de bacterias STEC. La forma tradicional para determinar la presencia de STEC, requiere aislar a la bacteria. Lamentablemente esto no siempre es posible, debido a la posibilidad de que se encuentre en muy bajas concentraciones, que se encuentre en un estado viable pero no cultivable o bien, que aparezcan interferencias con otras *E. coli* comensales presentes en la muestra. Además, en estos casos para aislarla se requiere un enriquecimiento de la muestra en un medio selectivo para STEC, lo que también podría provocar una propagación de los fagos Stx y otros fagos auto-propagadores.

Aislar STEC de determinadas muestras no es sencillo, y además es necesario emplear un tiempo muy valioso del que en determinados momentos no se dispone. Cuando se necesitan resultados con urgencia, ya sea en la industria alimentaria, en aduanas o sobre todo en los hospitales, donde el diagnóstico precoz de infección por STEC es crítico para el tratamiento de la enfermedad, poder discernir entre la presencia de STEC y otras *E. coli* no patógenas de las muestras es esencial. En el caso de STEC es particularmente crítica su detección precoz debido a la contraindicación para tratar STEC usando agentes antimicrobianos (lo que podría causar una inducción masiva de los fagos Stx2), y porque si ocurre insuficiencia renal se requiere atención intensiva urgente por el riesgo de desarrollar HUS (Wong *et al.*, 2000). Por este motivo, desde hace tiempo se utilizan métodos moleculares basados en el ADN (PCR, qPCR, NGS) (Paton and Paton, 2003; Perelle *et al.*, 2004; Gould, Bopp, *et al.*, 2009; Kagkli *et al.*, 2011). Los métodos moleculares para la detección de STEC se han centrado en aquellos factores que están claramente relacionados con la virulencia y, particularmente, aquellos que están estrechamente relacionados con la alta incidencia y gravedad en las infecciones humanas. Entre estos factores, la toxina Shiga (Stx) se considera el principal determinante de la patogenicidad, y la causante de las complicaciones más indeseables de la infección, como el HUS (Tarr *et al.*, 2005).

En la bibliografía se presenta muchos casos en los que hay detección de *stx* por estas técnicas moleculares pero no se logra aislar la cepa STEC de las mismas muestras (Martínez-Castillo and Muniesa, 2014). Esto podría ser debido a varias causas, entre ellas a un tratamiento previo del paciente con antibióticos, a un diagnóstico tardío, a que la célula bacteriana esta inactiva o está en

estado viable pero no cultivable o, simplemente, a que la bacteria está presente en números demasiado bajos. Sin embargo, en nuestro trabajo llamado **“Mejora de la detección de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga por métodos moleculares mediante la reducción de la interferencia de los bacteriófagos Stx”**, presentamos la posibilidad de que la presencia en las muestras de fagos Stx libres pueden generar un positivo por PCR e incluso generar secuencias en NGS, sin estar presente la bacteria. Dado que en STEC los genes *stx* están localizados en profagos, estos genes se encuentran por lo tanto flanqueados por secuencias del genoma fágico y no existe una manera fácil de distinguir si el gen detectado pertenece a una STEC o a un fago Stx libre, resultando en ciertas ocasiones en falsos positivos para STEC y pudiendo generar diagnósticos médicos erróneos y pérdidas monetarias importantes en la industria alimentaria.

Como ya hemos visto, la ingesta de fagos Stx libres puede ser un riesgo indirecto para la salud debido a la posible formación de lisógenos, pero dicho riesgo en ningún caso puede ser comparable en relación al grave peligro para los seres humanos que supone la presencia de las propias STEC, esto debe ser considerado y es necesario poder distinguir entre la presencia de STEC y la del fago libre.

Nuestro estudio confirma que los métodos rutinarios utilizados para la extracción de ADN bacteriano en estas matrices complejas de alimentos, ambientales y clínicas (Monday *et al.*, 2007; Grys *et al.*, 2009) también extraen el ADN fágico.

El método propuesto, basado en un sencillo paso previo de filtración y lavado de la muestra (ligeramente diferente en función del tipo de matriz), elimina considerablemente los niveles de bacteriófagos Stx, consiguiendo una reducción que va desde 2,6 hasta 3,35 logaritmos en función del tipo de muestra (PBS, agua de río, ensalada, carne, heces), sin alterar en absoluto los niveles de recuperación bacteriana.

El método propuesto es fácil y factible de realizar en laboratorios de rutina. Esta importante reducción en el número de bacteriófagos mejoraría la eficiencia y fiabilidad de las técnicas genómicas para la detección de STEC, evitando gran parte de los diagnósticos erróneos por falsos positivos en clínica y en controles de la industria alimentaria, razón por la que lotes enteros de alimentos son tirados innecesariamente generando importantes pérdidas económicas.

Sería necesaria una legislación que tuviera en consideración los bacteriófagos (y/o partículas fágicas) libres en el medio. Por un lado para considerar adecuadamente los riesgos asociados a la transferencia genética horizontal, como sería por ejemplo la posible transducción y diseminación de genes de virulencia o de ARGs a otras bacterias. Por otro lado, considerando que además de los fagos bien caracterizados que codifican genes de virulencia en STEC y fagos que llevan ARGs, muchos fagos líticos e incluso partículas tipo GTAs podrían movilizar genes bacterianos mediante mecanismos cercanos a la transducción generalizada. Por último, para optimizar las metodologías que proporcionen una detección clara y eficiente de los patógenos que implican riesgo para la salud humana.

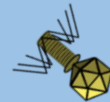
6. CONCLUSIONES



- Los genes de resistencia a antibióticos son abundantes en el ADN total y ADN fágico en las heces de individuos sanos. Concretamente los genes que codifican las β -lactamasas *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} y el gen *qnrA* que confiere protección ante quinolonas fueron especialmente numerosos en las muestras fecales de nuestro estudio.
- Estos genes de resistencia son excretados al medio en las heces dentro de partículas fágicas, lo que les confiere protección y la capacidad de ser transducidos a otras bacterias, transformando a estas en nuevas resistentes.
- La PCR cuantitativa para las variantes a, c y d del gen *stx*₁ diseñada en esta tesis, ha resultado ser la técnica más robusta y confiable para cuantificar fagos Stx1 en las muestras ambientales en relación a la microscopía electrónica de transición y a los ensayos de infectividad.
- Los fagos Stx1 son muchos menos abundantes en el medio (7,6%) que los fagos Stx2, presentes en un 68,4% de las muestras ambientales analizadas. Esto podría deberse, entre otros motivos, a que las cepas productoras de Stx1 no necesitan inducir el fago para expresar la toxina, al contrario de lo que ocurre con las cepas productoras de Stx2, cuya producción de toxina requiere previamente la inducción del bacteriófago.
- Los fagos Stx presentes de forma natural en las muestras de vegetales y tierra de cultivo propagan usando *E. coli* WG5 como cepa huésped, obteniéndose un aumento en las densidades de fagos Stx que van desde 1 hasta 5 unidades logarítmicas, confirmando así la capacidad infectiva y propagadora de estos fagos.
- Los datos de propagación, unidos a la persistencia mostrada por los fagos Stx2 tanto a 4 como a 23°C durante 10 días, y a los resultados positivos de transducción en todas las matrices vegetales y tierra testadas, confirma que en estos alimentos, consumidos crudos habitualmente, existe un riesgo de que ocurra la transducción del gen *stx*. Dicha transducción entre las enterobacterias (principalmente *E. coli*) que puedan estar presentes en estos alimentos causaría la aparición de nuevas cepas productoras de la toxina Shiga.
- Los métodos comerciales de extracción de ADN no discriminan entre ADN bacteriano y fágico. Es por esto que en ocasiones cuando se pretende detectar la presencia de STEC por métodos moleculares, pueden generarse falsos positivos debido a la presencia de fagos Stx en la muestra.
- El método desarrollado en esta tesis, basado en una sencilla etapa previa a la extracción de filtrado y lavado de la muestra, consigue una eliminación de hasta 3 unidades logarítmicas de bacteriófagos sin alterar en absoluto las densidades bacterianas de la muestra. El método propuesto mejora sustancialmente la eficacia y confiabilidad de los resultados de las pruebas moleculares para la detección de STEC.

- Sería necesaria que las legislaciones de aguas y alimentos, así como los protocolos de diagnóstico tuvieran en consideración los bacteriófagos (y/o partículas fágicas) libres en el medio. Valorando los riesgos asociados a la transferencia genética horizontal y a la interferencia de los fagos en las diversas muestras para la detección de patógenos bacterianos.

7. BIBLIOGRAFÍA



- Ackermann, H.-W. (2003) Bacteriophage observations and evolution. *Research in microbiology* **154**: 245–51.
- Aertsen, A., Fester, D., and Michiels, C.W. (2005) Induction of Shiga toxin-converting prophage in *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Applied and environmental microbiology* **71**: 1155–62.
- Allen, H.K., Looft, T., Bayles, D.O., Humphrey, S., Levine, U.Y., Alt, D., and Stanton, T.B. (2011) Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes. *mBio* **2**: e00260–11–e00260–11.
- Allué-Guardia, A., García-Aljaro, C., and Muniesa, M. (2011) Bacteriophage-encoding cytolethal distending toxin type V gene induced from nonclinical *Escherichia coli* isolates. *Infection and immunity* **79**: 3262–72.
- Allue-Guardia, A., Martinez-Castillo, A., and Muniesa, M. (2014) Persistence of Infectious Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages after Disinfection Treatments. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 2142–2149.
- Arkin, A., Ross, J., and McAdams, H.H. (1998) Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage lambda-infected *Escherichia coli* cells. *Genetics* **149**: 1633–48.
- Arnold, J.W. and Koudelka, G.B. (2014) The Trojan Horse of the microbiological arms race: phage-encoded toxins as a defence against eukaryotic predators. *Environmental microbiology* **16**: 454–66.
- Asadulghani, M., Ogura, Y., Ooka, T., Itoh, T., Sawaguchi, A., Iguchi, A., et al. (2009) The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS pathogens* **5**: e1000408.
- Ashelford, K.E., Day, M.J., and Fry, J.C. (2003) Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied and environmental microbiology* **69**: 285–9.
- Aslani, M.M., Alikhani, M.Y., Zavari, A., Yousefi, R., and Zamani, A.R. (2011) Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *International Journal of Infectious Diseases* **15**: e136–e139.
- Auvray, F., Dilasser, F., Bibbal, D., Kérourédan, M., Oswald, E., and Brugère, H. (2012) French cattle is not a reservoir of the highly virulent enteroaggregative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104:H4. *Veterinary Microbiology* **158**: 443–445.
- Baquero, F., Martínez, J.-L., and Cantón, R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology* **19**: 260–5.
- Berkner, S., Konradi, S., and Schonfeld, J. (2014) Antibiotic resistance and the environment--there and back again: Science & Society series on Science and Drugs. *EMBO reports* **15**: 740–744.
- Bernstein, N., Sela, S., Pinto, R., and Ioffe, M. (2007) Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of maize via the root system. *Journal of food protection* **70**: 471–5.
- Bétis, F., Brest, P., Hofman, V., Guignot, J., Bernet-Camard, M.-F., Rossi, B., et al. (2003) The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. *Infection and immunity* **71**: 1068–74.

- Beumer, A. and Robinson, J.B. (2005) A broad-host-range, generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. *Applied and environmental microbiology* **71**: 8301–4.
- Bielaszewska, M., Fell, M., Greune, L., Prager, R., Fruth, A., Tschäpe, H., et al. (2004) Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infection and immunity* **72**: 1812–6.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., et al. (2011) Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet. Infectious diseases* **11**: 671–6.
- Bielaszewska, M., Stoewe, F., Fruth, A., Zhang, W., Prager, R., Brockmeyer, J., et al. (2009) Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *Journal of clinical microbiology* **47**: 2061–6.
- Bilge, S.S., Clausen, C.R., Lau, W., and Moseley, S.L. (1989) Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Journal of bacteriology* **171**: 4281–9.
- Billard-Pomares, T., Fouteau, S., Jacquet, M.E., Roche, D., Barbe, V., Castellanos, M., et al. (2014) Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum β -lactamase from an *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**: 6550–7.
- Biotechkhan.wordpress (2014) No Title.
- Bobay, L.-M., Rocha, E.P.C., and Touchon, M. (2013) The adaptation of temperate bacteriophages to their host genomes. *Molecular biology and evolution* **30**: 737–51.
- Bobay, L.-M., Touchon, M., and Rocha, E.P.C. (2014) Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 12127–32.
- Boerlin, P., McEwen, S. a, Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., and Gyles, C.L. (1999) Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of clinical microbiology* **37**: 497–503.
- Bondy-Denomy, J. and Davidson, A.R. (2014) When a virus is not a parasite: the beneficial effects of prophages on bacterial fitness. *Journal of Microbiology* **52**: 235–242.
- Bosilevac, J.M. and Koohmaraie, M. (2011) Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Applied and environmental microbiology* **77**: 2103–12.
- Le Bouguéneq, C., Lalioui, L., du Merle, L., Jouve, M., Courcoux, P., Bouzari, S., et al. (2001) Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *Journal of clinical microbiology* **39**: 1738–45.
- Boujelben, I., Yarza, P., Almansa, C., Villamor, J., Maalej, S., Antón, J., and Santos, F. (2012) Virioplankton community structure in Tunisian solar salterns. *Applied and environmental microbiology* **78**: 7429–37.
- Bradford, S.A. et al. (2013) Transport and Fate of Microbial Pathogens in Agricultural Settings. *Crit.*

- Rev. Environ. Sci. Technol.* **43**: 775–893.
- Brimacombe, C.A., Ding, H., and Beatty, J.T. (2014) Rhodobacter capsulatus DprA is essential for RecA-mediated gene transfer agent (RcGTA) recipient capability regulated by quorum-sensing and the CtrA response regulator. *Molecular microbiology* **92**: 1260–78.
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., Miró, E., González-López, J.J., et al. (2017) Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., and Muniesa, M. (2015a) CRE. *Plasmid* **79C**: 1–7.
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., and Muniesa, M. (2015b) Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* **79**: 1–7.
- Brunder, W., Schmidt, H., and Karch, H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular microbiology* **24**: 767–78.
- Brüssow, H., Canchaya, C., and Hardt, W.-D. (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **68**: 560–602, table of contents.
- Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M.M., Remschmidt, C., Wilking, H., et al. (2011) German Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Associated with Sprouts. *New England Journal of Medicine* **365**: 1763–1770.
- Butala, M., Zgur-Bertok, D., and Busby, S.J.W. (2009) The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and molecular life sciences* : *CMLS* **66**: 82–93.
- Calderwood, S.B. and Mekalanos, J.J. (1987) Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus. *Journal of bacteriology* **169**: 4759–64.
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., and Muniesa, M. (2014) Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions. *Environmental Science & Technology* **48**: 7602–7611.
- Cambau, E., Lascols, C., Sougakoff, W., Bébéar, C., Bonnet, R., Cavallo, J.-D., et al. (2006) Occurrence of qnrA-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002–2005. *Clinical Microbiology and Infection* **12**: 1013–1020.
- Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M.L., and Brüssow, H. (2003) Phage as agents of lateral gene transfer. *Current opinion in microbiology* **6**: 417–24.
- Canpolat, N. (2015) Hemolytic uremic syndrome. *Türk Pediatri Arşivi* **50**: 73–81.
- Cantón, R. and Coque, T.M. (2006) The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current opinion in microbiology* **9**: 466–75.
- Celli, J., Deng, W., and Finlay, B.B. (2000) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cellular microbiology* **2**: 1–9.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) About Antimicrobial Resistance.
- Chase-Topping, M.E., McKendrick, I.J., Pearce, M.C., MacDonald, P., Matthews, L., Halliday, J., et al.

- (2007) Risk factors for the presence of high-level shedders of *Escherichia coli* O157 on Scottish farms. *Journal of clinical microbiology* **45**: 1594–603.
- Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Salim, S.Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., et al. (2011) Crohn disease--associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *The Journal of clinical investigation* **121**: 966–75.
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., and Brüßow, H. (2004) Phage-host interaction: an ecological perspective. *Journal of bacteriology* **186**: 3677–86.
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011) Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**: 4908–4911.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011) Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS one* **6**: e17549.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2014) Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**: 1265–74.
- Cornick, N.A., Helgerson, A.F., Mai, V., Ritchie, J.M., and Acheson, D.W.K. (2006) In vivo transduction of an *Stx*-encoding phage in ruminants. *Applied and environmental microbiology* **72**: 5086–8.
- Cortés, P., Cano-Sarabia, M., Colom, J., Otero, J., Maspoch, D., and Llagostera, M. (2018) Nano/Micro Formulations for Bacteriophage Delivery. In, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 271–283.
- Cowan S.T. (1954) Abbreviation of bacterial generic names. *Science* **120(3131)**: 1103–4.
- Crocker, T. and Bennett, B. (1952) Electron microscopic counting of elementary bodies of the virus of meningo-pneumonitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **69**: 183–96.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., and Finlay, B.B. (2013) Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* **26**: 822–880.
- D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., and Wright, G.D. (2006) Sampling the antibiotic resistome. *Science (New York, N.Y.)* **311**: 374–7.
- Danovaro, R., Manini, E., and Dell'Anno, A. (2002) Higher abundance of bacteria than of viruses in deep Mediterranean sediments. *Applied and environmental microbiology* **68**: 1468–72.
- Dantas, G., Sommer, M.O. a, Oluwasegun, R.D., and Church, G.M. (2008) Bacteria subsisting on antibiotics. *Science (New York, N.Y.)* **320**: 100–3.
- Delignette-Muller, M.L., Cornu, M., and AFSSA STEC study group (2008) Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households. *International journal of food microbiology* **128**: 158–64.
- Deurenberg, R.H. and Stobberingh, E.E. (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **8**: 747–63.
- Dhanji, H., Murphy, N.M., Akhigbe, C., Doumith, M., Hope, R., Livermore, D.M., and Woodford, N. (2011) Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14

- extended-spectrum β -lactamase from UK river water. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66**: 512–516.
- Dinu, L.-D. and Bach, S. (2011) Induction of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the Phyllosphere of Lettuce: a Food Safety Risk Factor. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 8295–8302.
- Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Jacobs, E., and Röske, I. (2006) Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. *Letters in applied microbiology* **42**: 48–53.
- Eklund, M.W., Poysky, F.T., Reed, S.M., and Smith, C.A. (1971) Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type C. *Science (New York, N.Y.)* **172**: 480–2.
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B., and Petit, M.-A. (2017) Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *The ISME journal* **11**: 237–247.
- Engelberg-Kulka, H. and Kumar, S. (2015) Yet another way that phage λ manipulates its *Escherichia coli* host: λ rexB is involved in the lysogenic-lytic switch. *Molecular microbiology* **96**: 689–93.
- Escherich, T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. *Reviews of infectious diseases* **10**: 1220–5.
- Everis, L. (2004) Risks of pathogens in ready-to-eat fruits, vegetables, and salads through the production process. *Campden BRI Review* 1–160.
- Farfan, M.J., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D.J., and Torres, A.G. (2011) Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infection and immunity* **79**: 3744–50.
- Farfán-García, A.E., Ariza-Rojas, S.C., Vargas-Cárdenas, F.A., and Vargas-Remolina, L.V. (2016) Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología* **33**: 438–450.
- Ferens, W.A. and Hovde, C.J. (2011) *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. *Foodborne Pathogens and Disease* **8**: 465–487.
- Fernandes, R.M., de Lencastre, H., and Archer, L.J. (1989) Specialized transduction in *Bacillus subtilis* by the phages IG1, IG3, and IG4. *Archives of virology* **105**: 137–40.
- Finley, R.L., Collignon, P., Larsson, D.G.J., McEwen, S.A., Li, X.-Z., Gaze, W.H., et al. (2013) The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. *Clinical Infectious Diseases* **57**: 704–710.
- Fleming, A. (1945) Penicillin. *Nobel Lecture*.
- Fogg, P.C.M., Westbye, A.B., and Beatty, J.T. (2012) One for All or All for One: Heterogeneous Expression and Host Cell Lysis Are Key to Gene Transfer Agent Activity in *Rhodobacter capsulatus*. *PLoS ONE* **7**: e43772.
- Fortier, L.-C. and Sekulovic, O. (2013) Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* **4**: 354–65.
- França, F.L.S., Wells, T.J., Browning, D.F., Nogueira, R.T., Sarges, F.S., Pereira, A.C., et al. (2013) Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children

in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS one* **8**: e69971.

- Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., et al. (2011) Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine* **365**: 1771–1780.
- Franz, E. and van Bruggen, A.H.C. (2008) Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. *Critical reviews in microbiology* **34**: 143–61.
- 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. *Journal of clinical microbiology* **44**: 1844–6.
- Fries, J.S., Characklis, G.W., and Noble, R.T. (2008) Sediment-water exchange of *Vibrio* sp. and fecal indicator bacteria: implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water research* **42**: 941–50.
- Fuller, C.A., Pellino, C.A., Flagler, M.J., Strasser, J.E., and Weiss, A.A. (2011) Shiga Toxin Subtypes Display Dramatic Differences in Potency. *Infection and Immunity* **79**: 1329–1337.
- Gagliardi, J. V and Karns, J.S. (2000) Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Applied and environmental microbiology* **66**: 877–83.
- Galán, J.-C., González-Candelas, F., Rolain, J.-M., and Cantón, R. (2013) Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the β -lactamases world. *Frontiers in microbiology* **4**: 9.
- Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., and Lambert, T. (2005) Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 2949–53.
- Gandon, S. (2016) Why Be Temperate: Lessons from Bacteriophage λ . *Trends in microbiology* **24**: 356–65.
- García-Aljaro, C., Ballesté, E., Muniesa, M., and Jofre, J. (2017) Determination of *crAssphage* in water samples and applicability for tracking human faecal pollution. *Microbial Biotechnology* **10**: 1775–1780.
- García-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J., and Blanch, A.R. (2009) Genotypic and Phenotypic Diversity among Induced, *stx2*-Carrying Bacteriophages from Environmental *Escherichia coli* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 329–336.
- Gault, G., Weill, F.X., Mariani-Kurkdjian, P., Jourdan-da Silva, N., King, L., Aldabe, B., et al. (2011) Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **16**.
- Gill, D.M., Uchida, T., and Singer, R.A. (1972) Expression of diphtheria toxin genes carried by integrated and nonintegrated phage beta. *Virology* **50**: 664–8.
- Gordon, D.M. (2013) The ecology of *Escherichia coli*.
- Gould, L.H., Bopp, C., Strockbine, N., Atkinson, R., Baselski, V., Body, B., et al. (2009) Recommendations for diagnosis of shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report*.

Recommendations and reports **58**: 1–14.

- Gould, L.H., Demma, L., Jones, T.F., Hurd, S., Vugia, D.J., Smith, K., et al. (2009) Hemolytic uremic syndrome and death in persons with *Escherichia coli* O157:H7 infection, foodborne diseases active surveillance network sites, 2000-2006. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49**: 1480–5.
- De Grandis, S., Ginsberg, J., Toone, M., Climie, S., Friesen, J., and Brunton, J. (1987) Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. *Journal of bacteriology* **169**: 4313–9.
- Grys, T.E., Sloan, L.M., Rosenblatt, J.E., and 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. *Journal of clinical microbiology* **47**: 2008–12.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., and Andersson, D.I. (2011) Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathogens* **7**: e1002158.
- Gyles, C.L. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview1. *Journal of Animal Science* **85**: E45–E62.
- Haaber, J., Leisner, J.J., Cohn, M.T., Catalan-Moreno, A., Nielsen, J.B., Westh, H., et al. (2016) Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nature communications* **7**: 13333.
- Hale, C.R., Scallan, E., Cronquist, A.B., Dunn, J., Smith, K., Robinson, T., et al. (2012) Estimates of Enteric Illness Attributable to Contact With Animals and Their Environments in the United States. *Clinical Infectious Diseases* **54**: S472–S479.
- Harada, T., Itoh, K., Yamaguchi, Y., Hirai, Y., Kanki, M., Kawatsu, K., et al. (2013) A foodborne outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169:H41 in Osaka, Japan. *Japanese journal of infectious diseases* **66**: 530–3.
- Harnisz, M., Korzeniewska, E., and Gołaś, I. (2015) The impact of a freshwater fish farm on the community of tetracycline-resistant bacteria and the structure of tetracycline resistance genes in river water. *Chemosphere* **128**: 134–141.
- Harris, L.J. et al (2003) Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**: 78–141.
- Harris, S.M., Yue, W.-F., Olsen, S. a, Hu, J., Means, W.J., McCormick, R.J., et al. (2012) Salt at concentrations relevant to meat processing enhances Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* O157:H7. *International journal of food microbiology* **159**: 186–92.
- Harrison, E. and Brockhurst, M.A. (2017) Ecological and Evolutionary Benefits of Temperate Phage: What Does or Doesn't Kill You Makes You Stronger. *BioEssays* 1700112.
- Heiman, K.E., Mody, R.K., Johnson, S.D., Griffin, P.M., and Gould, L.H. (2015) *Escherichia coli* O157 Outbreaks in the United States, 2003-2012. *Emerging infectious diseases* **21**: 1293–1301.
- Hendrix, R.W., Smith, M.C., Burns, R.N., Ford, M.E., and Hatfull, G.F. (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 2192–7.

- Hennes KP and Suttle CA (1995) Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1050–1055.
- Herskowitz, I. and Hagen, D. (1980) The lysis-lysogeny decision of phage lambda: explicit programming and responsiveness. *Annual review of genetics* **14**: 399–445.
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., et al. (2008) NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection control and hospital epidemiology* **29**: 996–1011.
- Howard-Flanders, P. and Theriot, L. (1966) Mutants of *Escherichia coli* K-12 defective in DNA repair and in genetic recombination. *Genetics* **53**: 1137–50.
- Hsia, R.C., Small, P.L., and Bavoil, P.M. (1993) Characterization of virulence genes of enteroinvasive *Escherichia coli* by TnphoA mutagenesis: identification of *invX*, a gene required for entry into HEp-2 cells. *Journal of bacteriology* **175**: 4817–23.
- Hsu, B.-M., Wu, S.-F., Huang, S.-W., Tseng, Y.-J., Ji, D.-D., Chen, J.-S., and Shih, F.-C. (2010) Differentiation and identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental waters by a molecular method and biochemical test. *Water Research* **44**: 949–955.
- Hudault, S., Spiller, O.B., Morgan, B.P., and Servin, A.L. (2004) Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins That Use Human CD55 (Decay-Accelerating Factor) as a Receptor Does Not Bind the Rodent and Pig Analogues of CD55. *Infection and Immunity* **72**: 4859–4863.
- Hughes, V.M. and Datta, N. (1983) Conjugative plasmids in bacteria of the “pre-antibiotic” era. *Nature* **302**: 725–6.
- Humphrey, S.B., Stanton, T.B., Jensen, N.S., and Zuerner, R.L. (1997) Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of *Serpulina hydysenteriae*. *Journal of bacteriology* **179**: 323–9.
- Hyder, S.L. and Streitfeld, M.M. (1978) Transfer of erythromycin resistance from clinically isolated lysogenic strains of *Streptococcus pyogenes* via their endogenous phage. *The Journal of infectious diseases* **138**: 281–6.
- Hynes, A.P., Mercer, R.G., Watton, D.E., Buckley, C.B., and Lang, A.S. (2012) DNA packaging bias and differential expression of gene transfer agent genes within a population during production and release of the *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent, RcGTA. *Molecular microbiology* **85**: 314–25.
- Imamovic, L., Balleste, E., Jofre, J., and Muniesa, M. (2010) Quantification of Shiga Toxin-Converting Bacteriophages in Wastewater and in Fecal Samples by Real-Time Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 5693–5701.
- Imamovic, L., Ballesté, E., Martínez-Castillo, A., García-Aljaro, C., and Muniesa, M. (2016) Heterogeneity in phage induction enables the survival of the lysogenic population. *Environmental microbiology* **18**: 957–69.
- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., and Muniesa, M. (2009) Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Applied and environmental microbiology* **75**: 1764–8.

- Imamovic, L. and Muniesa, M. (2011) Quantification and Evaluation of Infectivity of Shiga Toxin- Encoding Bacteriophages in Beef and Salad. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 3536–3540.
- Imamovic, L., Serra-Moreno, R., Jofre, J., and Muniesa, M. (2010) Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. *Journal of Applied Microbiology* **108**: 1105–1114.
- Iman-Eini, H., Haghi-Ashtiani, M.T., Emaneini, M., Aligholi, M., Taherikalani, M., Hosseini, H., et al. (2013) Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated from children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* **62**: 191–195.
- In, J., Lukyanenko, V., Foulke-Abel, J., Hubbard, A.L., Delannoy, M., Hansen, A.-M., et al. (2013) Serine protease EspP from enterohemorrhagic Escherichia coli is sufficient to induce shiga toxin macropinocytosis in intestinal epithelium. *PloS one* **8**: e69196.
- Ingraham, J.L.I.C.A. (1998) Introducción a la Microbiología.
- Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., and Jiang, X. (2004) Persistence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of food protection* **67**: 1365–70.
- Ito, H., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., and Nishibuchi, M. (1990) Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from Escherichia coli O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microbial pathogenesis* **8**: 47–60.
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., et al. (2008) qnr Gene nomenclature. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**: 2297–9.
- James, C.E., Stanley, K.N., Allison, H.E., Flint, H.J., Stewart, C.S., Sharp, R.J., et al. (2001) Lytic and lysogenic infection of diverse Escherichia coli and Shigella strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. *Applied and environmental microbiology* **67**: 4335–7.
- Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M.J., Byappanahalli, M.N., Yan, T., and Ishii, S. (2017) Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*.
- Jang, J., Suh, Y.-S., Di, D.Y.W., Unno, T., Sadowsky, M.J., and Hur, H.-G. (2013) Pathogenic Escherichia coli strains producing extended-spectrum β -lactamases in the Yeongsan River basin of South Korea. *Environmental science & technology* **47**: 1128–36.
- Jarvis, W. R. and Martone, W.J. (1992) Predominant pathogens in hospital infections. *Antimicrob Chemother* **29**: 19–24.
- Jobling, M.G. and Holmes, R.K. (2012) Type II Heat-Labile Enterotoxins from 50 Diverse Escherichia coli Isolates Belong Almost Exclusively to the LT-IIc Family and May Be Prophage Encoded. *PLoS ONE* **7**: e29898.
- Joh, R.I. and Weitz, J.S. (2011) To Lyse or Not to Lyse: Transient-Mediated Stochastic Fate Determination in Cells Infected by Bacteriophages. *PLoS Computational Biology* **7**: e1002006.
- Johannes, L. and Römer, W. (2010) Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nature reviews. Microbiology* **8**: 105–16.

- Juhas, M. (2015) Horizontal gene transfer in human pathogens. *Critical Reviews in Microbiology* **41**: 101–108.
- Kagkli, D.-M., Weber, T.P., Van den Bulcke, M., Folloni, S., Tozzoli, R., Morabito, S., et al. (2011) Application of the modular approach to an in-house validation study of real-time PCR methods for the detection and serogroup determination of verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **77**: 6954–63.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* **2**: 123–40.
- Karmali, M.A. (2017) Emerging Public Health Challenges of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Related to Changes in the Pathogen, the Population, and the Environment. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **64**: 371–376.
- Karmali, M.A., Gannon, V., and Sargeant, J.M. (2010) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary microbiology* **140**: 360–70.
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Petric, M., Dutil, L., Rahn, K., Ludwig, K., et al. (2003) Age-specific frequencies of antibodies to *Escherichia coli* verocytotoxins (Shiga toxins) 1 and 2 among urban and rural populations in southern Ontario. *The Journal of infectious diseases* **188**: 1724–9.
- Kenzaka, T., Tani, K., and Nasu, M. (2010) High-frequency phage-mediated gene transfer in freshwater environments determined at single-cell level. *The ISME journal* **4**: 648–59.
- Khalil, R.K.S., Skinner, C., Patfield, S., and He, X. (2016) Phage-mediated Shiga toxin (Stx) horizontal gene transfer and expression in non-Shiga toxigenic *Enterobacter* and *Escherichia coli* strains. *Pathogens and Disease* **74**: ftw037.
- Kimmitt, P., Harwood, C.R., and Barer, M.R. (2000) Toxin Gene Expression by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: the Role of Antibiotics and the Bacterial SOS Response. *Emerging Infectious Diseases* **6**: 458–465.
- Kloesges, T., Popa, O., Martin, W., and Dagan, T. (2011) Networks of gene sharing among 329 proteobacterial genomes reveal differences in lateral gene transfer frequency at different phylogenetic depths. *Molecular biology and evolution* **28**: 1057–74.
- Knapp, C.W., Dolfig, J., Ehler, P.A.I., and Graham, D.W. (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental science & technology* **44**: 580–7.
- Konczy, P., Ziebell, K., Mascarenhas, M., Choi, A., Michaud, C., Kropinski, A.M., et al. (2008) Genomic O Island 122, Locus for Enterocyte Effacement, and the Evolution of Virulent Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **190**: 5832–5840.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I., and Stavric, S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **18**: 775–9.
- Krüger, A. and Lucchesi, P.M.A. (2015) Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology* **161**: 451–462.
- Krüger, N.-J. and Stingl, K. (2011) Two steps away from novelty - principles of bacterial DNA uptake. *Molecular Microbiology* **80**: 860–867.
- Kudva, I.T., Blanch, K., and Hovde, C.J. (1998) Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and environmental microbiology* **64**: 3166–74.

- de la Cabada Bauche, J. and Dupont, H.L. (2011) New Developments in Traveler's Diarrhea. *Gastroenterology & hepatology* **7**: 88–95.
- Lachmayr, K.L., Kerkhof, L.J., DiRienzo, A.G., Cavanaugh, C.M., and Ford, T.E. (2009) Quantifying Nonspecific TEM -Lactamase (blaTEM) Genes in a Wastewater Stream. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 203–211.
- Lang, A.S. and Beatty, J.T. (2000) Genetic analysis of a bacterial genetic exchange element: the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 859–64.
- Lang, A.S. and Beatty, J.T. (2007) Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria. *Trends in microbiology* **15**: 54–62.
- Lang, A.S. and Beatty, J.T. (2001) The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus* and "constitutive transduction" in prokaryotes. *Archives of microbiology* **175**: 241–9.
- Lang, A.S., Zhaxybayeva, O., and Beatty, J.T. (2012) Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nature reviews. Microbiology* **10**: 472–82.
- Lee, S.-Y., Cherla, R.P., Caliskan, I., and Tesh, V.L. (2005) Shiga toxin 1 induces apoptosis in the human myelogenous leukemia cell line THP-1 by a caspase-8-dependent, tumor necrosis factor receptor-independent mechanism. *Infection and immunity* **73**: 5115–26.
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C.M., and Balcázar, J.L. (2017) Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **220**: 981–984.
- Lepage, P., Colombet, J., Marteau, P., Sime-Ngando, T., Doré, J., and Leclerc, M. (2008) Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* **57**: 424–5.
- Letarov, A. and Kulikov, E. (2009) The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *Journal of applied microbiology* **107**: 1–13.
- Leung, M.M., Brimacombe, C.A., Spiegelman, G.B., and Beatty, J.T. (2012) The GtaR protein negatively regulates transcription of the gtaRI operon and modulates gene transfer agent (RcGTA) expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular microbiology* **83**: 759–74.
- Levy, S.B. (1998) The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* **278**: 46–53.
- Levy, S.B. and Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine* **10**: S122–9.
- Lindell, D., Sullivan, M.B., Johnson, Z.I., Tolonen, A.C., Rohwer, F., and Chisholm, S.W. (2004) Transfer of photosynthesis genes to and from *Prochlorococcus* viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 11013–11018.
- Liu, L., Johnson, H.L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J.E., et al. (2012) Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet* **379**: 2151–2161.
- Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., et al. (2012) In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 1691–1696.
- Ma, J., Mark Ibekwe, A., Crowley, D.E., and Yang, C.-H. (2014) Persistence of *Escherichia coli* O157

- and non-O157 strains in agricultural soils. *Science of The Total Environment* **490**: 822–829.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C., and Peixe, L. (2013) Commensal Enterobacteriaceae as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal. *Frontiers in microbiology* **4**: 80.
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R.P., and van Sinderen, D. (2011) Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 157–163.
- Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C.H., et al. (1998) Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **5**: 1–9.
- Mann, N.H., Cook, A., Millard, A., Bailey, S., and Clokie, M. (2003) Marine ecosystems: bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature* **424**: 741.
- Marrs, B. (1974) Genetic recombination in Rhodopseudomonas capsulata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 971–3.
- Marti, E., Variatza, E., and Balcázar, J.L. (2014) Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clinical Microbiology and Infection* **20**: O456–O459.
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y.-C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., and Topp, E. (2013) Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and environmental microbiology* **79**: 5701–9.
- Martinez, J.L. (2008) Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science* **321**: 365–367.
- Martínez-Castillo, A. and 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. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **4**: 46.
- Martinez-Castillo, A., Quiros, P., Navarro, F., Miro, E., and Muniesa, M. (2013) Shiga Toxin 2-Encoding Bacteriophages in Human Fecal Samples from Healthy Individuals. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 4862–4868.
- Matic, I., Rayssiguier, C., and Radman, M. (1995) Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell* **80**: 507–15.
- Matilla, M.A., Fang, X., and Salmond, G.P.C. (2014) Viunalikeviruses are environmentally common agents of horizontal gene transfer in pathogens and biocontrol bacteria. *The ISME journal* **8**: 2143–7.
- Mazaheri Nezhad Fard, R., Barton, M.D., and Heuzenroeder, M.W. (2011) Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Letters in applied microbiology* **52**: 559–64.
- McCloskey, R. V (1973) Scarlet fever and necrotizing fasciitis caused by coagulase-positive hemolytic Staphylococcus aureus, phage type 85. *Annals of internal medicine* **78**: 85–7.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 1664–8.

- Melton-Celsa, A.R. (2014) Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology Spectrum* **2**: EHEC–0024–2013.
- Meltz Steinberg, K. and Levin, B.R. (2007) Grazing protozoa and the evolution of the Escherichia coli O157:H7 Shiga toxin-encoding prophage. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 1921–1929.
- Menouni, R., Hutinet, G., Petit, M.-A., and Ansaldi, M. (2015) Bacterial genome remodeling through bacteriophage recombination. *FEMS microbiology letters* **362**: 1–10.
- Mercer, R.G., Quinlan, M., Rose, A.R., Noll, S., Beatty, J.T., and Lang, A.S. (2012) Regulatory systems controlling motility and gene transfer agent production and release in Rhodobacter capsulatus. *FEMS microbiology letters* **331**: 53–62.
- Mikhail, A.F.W., Jenkins, C., Dallman, T.J., Inns, T., Martín, A.I.C., Fox, A., et al. (2017) An outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 associated with contaminated salad leaves: epidemiological, genomic and food trace back investigations. *Epidemiology and Infection* 1–10.
- Millan, A.S., Toll-Riera, M., Qi, Q., and MacLean, R.C. (2015) Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in Pseudomonas aeruginosa. *Nature Communications* **6**: 6845.
- Mir-Sanchis, I., Martínez-Rubio, R., Martí, M., Chen, J., Lasa, Í., Novick, R.P., et al. (2012) Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision. *Molecular Microbiology* **85**: 833–845.
- Mit'kina, L.N. (2003) [Transposition as a way of existence: phage Mu]. *Genetika* **39**: 637–56.
- Mizuuchi, K. (1983) In vitro transposition of bacteriophage Mu: a biochemical approach to a novel replication reaction. *Cell* **35**: 785–94.
- Modi, S.R., Lee, H.H., Spina, C.S., and Collins, J.J. (2013) Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* **499**: 219–22.
- Mohamed, J.A., Huang, D.B., Jiang, Z.-D., DuPont, H.L., Nataro, J.P., Belkind-Gerson, J., and Okhuysen, P.C. (2007) Association of putative enteroaggregative Escherichia coli virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *Journal of clinical microbiology* **45**: 121–6.
- Monday, S.R., Beisaw, A., and Feng, P.C.H. (2007) Identification of Shiga toxigenic Escherichia coli seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Molecular and cellular probes* **21**: 308–11.
- Monecke, S., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E., Weill, F.-X., Balière, C., Slickers, P., and Ehricht, R. (2011) Presence of enterohemorrhagic Escherichia coli ST678/O104:H4 in France prior to 2011. *Applied and environmental microbiology* **77**: 8784–6.
- Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., and Caprioli, A. (1998) Enteroaggregative, Shiga toxin-producing Escherichia coli O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of clinical microbiology* **36**: 840–2.
- Müller, M.G., Ing, J.Y., Cheng, M.K.-W., Flitter, B.A., and Moe, G.R. (2013) Identification of a phage-encoded Ig-binding protein from invasive Neisseria meningitidis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **191**: 3287–96.
- Muniesa and Schmidt (2014) Shiga Toxin-encoding Phages: Multifunctional Gene Ferries. In, *Pathogenic Escherichia coli.*, pp. 57–78.

- Muniesa, Blanco, Simón, D., Serra-Moreno, Blanch, and Jofre (2004) Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology (Reading, England)* **150**: 2959–71.
- Muniesa, M., Colomer-Lluch, M., and Jofre, J. (2013a) Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations? *Mobile genetic elements* **3**: e25847.
- Muniesa, M., Colomer-Lluch, M., and Jofre, J. (2013b) Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future microbiology* **8**: 739–51.
- Muniesa, M., García, A., Miró, E., Mirelis, B., Prats, G., Jofre, J., and Navarro, F. (2004) Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerging infectious diseases* **10**: 1134–7.
- Muniesa, M., Hammerl, J.A., Hertwig, S., Appel, B., and Brüßow, H. (2012) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Applied and environmental microbiology* **78**: 4065–73.
- 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. *Applied and environmental microbiology* **64**: 2443–8.
- Muniesa, M. and Jofre, J. (2000) Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the Stx 2 gene in sewage from different countries. *FEMS microbiology letters* **183**: 197–200.
- Muniesa, M., Lucena, F., and Jofre, J. (1999) Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *Journal of applied microbiology* **87**: 402–9.
- 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. *Infection and Immunity* **74**: 4190–4199.
- Muniesa, M., Serra-Moreno, R., and Jofre, J. (2004) Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the stx genes appeared conserved. *Environmental Microbiology* **6**: 716–725.
- Murinda, S.E., Nguyen, L.T., Landers, T.L., Draughon, F.A., Mathew, A.G., Hogan, J.S., et al. (2004) Comparison of *Escherichia coli* Isolates from humans, food, and farm and companion animals for presence of Shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers. *Foodborne pathogens and disease* **1**: 178–84.
- Nanda, A.M., Thormann, K., and Frunzke, J. (2015) Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *Journal of bacteriology* **197**: 410–9.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* **11**: 142–201.
- Navarro-Garcia, F. (2014) *Escherichia coli* O104:H4 Pathogenesis: an Enteroaggregative *E. coli*/Shiga Toxin-Producing *E. coli* Explosive Cocktail of High Virulence. *Microbiology spectrum* **2**:
- Navarro-Garcia, F. and Elias, W.P. (2011) Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes* **2**: 13–24.

- Neely, M.N. and 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. *Molecular microbiology* **28**: 1255–67.
- Nguyen, Y. and Sperandio, V. (2012) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**: 90.
- Nilsson, A.I., Koskiniemi, S., Eriksson, S., Kugelberg, E., Hinton, J.C.D., and Andersson, D.I. (2005) From The Cover: Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 12112–12116.
- Nizetic, D., Drmanac, R., and Lehrach, H. (1991) An improved bacterial colony lysis procedure enables direct DNA hybridisation using short (10, 11 bases) oligonucleotides to cosmids. *Nucleic acids research* **19**: 182.
- Nyambe, S., Burgess, C., Whyte, P., and Bolton, D. (2016) The Survival of a Temperate vtx Bacteriophage and an Anti-Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 Lytic Phage in Water and Soil Samples. *Zoonoses and Public Health* **63**: 632–640.
- O'Brien, A.D. and LaVeck, G.D. (1983) Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **40**: 675–83.
- O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.K., Smith, H.W., and Formal, S.B. (1984) Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science (New York, N.Y.)* **226**: 694–6.
- Obeng, N., Pratama, A.A., and Elsas, J.D. van (2016) The Significance of Mutualistic Phages for Bacterial Ecology and Evolution. *Trends in microbiology* **24**: 440–9.
- Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani, Terajima, J., Nougayrède, J.-P., Kurokawa, K., et al. (2007) Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome biology* **8**: R138.
- Okhuysen, P.C. and Dupont, H.L. (2010) Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *The Journal of infectious diseases* **202**: 503–5.
- Oliver, A., Coque, T.M., Alonso, D., Valverde, A., Baquero, F., and Cantón, R. (2005) CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 1567–71.
- Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., García, S., and de la Fuente, R. (1999) Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Veterinary microbiology* **66**: 265–73.
- Otawa, K., Lee, S.H., Yamazoe, A., Onuki, M., Satoh, H., and Mino, T. (2007) Abundance, diversity, and dynamics of viruses on microorganisms in activated sludge processes. *Microbial ecology* **53**: 143–52.
- Otter, J.A. and French, G.L. (2011) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection* **79**: 189–193.
- De Paepe, M., Tournier, L., Moncaut, E., Son, O., Langella, P., and Petit, M.-A. (2016) Carriage of λ Latent Virus Is Costly for Its Bacterial Host due to Frequent Reactivation in Monoxenic Mouse Intestine. *PLoS genetics* **12**: e1005861.

- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., and Larsson, D.G.J. (2016) The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. *Microbiome* **4**: 54.
- Parreira, V.R. and Gyles, C.L. (2002) Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology* **87**: 341–52.
- Parsley, L.C., Consuegra, E.J., Kakirde, K.S., Land, A.M., Harper, W.F., and Liles, M.R. (2010) Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage. *Applied and environmental microbiology* **76**: 3753–7.
- Patel, S. (2016) Drivers of bacterial genomes plasticity and roles they play in pathogen virulence, persistence and drug resistance. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **45**: 151–164.
- Paton, A.W., Woodrow, M.C., Doyle, R.M., Lanser, J.A., and 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. *Journal of clinical microbiology* **37**: 3357–61.
- Paton, J.C. and Paton, A.W. (2003) Methods for detection of STEC in humans. An overview. *Methods in molecular medicine* **73**: 9–26.
- Paul JH and Kellogg CA (2000) Ecology of bacteriophages in nature. In: *Viral Ecology*. Hurst CJ (Ed.). Academic Press, CA, USA 211–246.
- Paul, J.H. (2008) Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *The ISME Journal* **2**: 579–589.
- Penadés, J.R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., and Novick, R.P. (2015) Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current opinion in microbiology* **23**: 171–8.
- PENG, J., YANG, J., and JIN, Q. (2009) The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infection, Genetics and Evolution* **9**: 147–152.
- Pereira, A.C.M., Britto-Filho, J.D., José de Carvalho, J., de Luna, M. das G., and Rosa, A.C.P. (2008) Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. *Microbial pathogenesis* **45**: 310–4.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., and Fach, P. (2004) Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and cellular probes* **18**: 185–92.
- Perry, J.A. and Wright, G.D. (2014) Forces shaping the antibiotic resistome. *BioEssays* **36**: 1179–1184.
- Petty, N.K., Toribio, A.L., Goulding, D., Foulds, I., Thomson, N., Dougan, G., and Salmond, G.P.C. (2007) A generalized transducing phage for the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Microbiology (Reading, England)* **153**: 2984–8.
- Ponce de León-Rosales, S., Arredondo-Hernández, R., and López-Vidal, Y. (2015) [Resistance to antibiotic: A serious global problem]. *Gaceta medica de Mexico* **151**: 681–9.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D.A. (2004) *Microbiología*, 5th edn. **McGraw-Hil**.
- Qadri, F., Svennerholm, A.-M., Faruque, A.S.G., and Sack, R.B. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli*

- in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews* **18**: 465–483.
- Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., Alonso, J.C., Novick, R.P., Marina, A., and Penadés, J.R. (2014) Staphylococcal pathogenicity island DNA packaging system involving cos-site packaging and phage-encoded HNH endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 6016–21.
- Radman, M., Matic, I., and Taddei, F. (1999) Evolution of evolvability. *Annals of the New York Academy of Sciences* **870**: 146–55.
- Ramirez, M.S., Tran, T., Tolmasky, M.E., Lin, D.L., and Traglia, G.M. (2014) Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiology Spectrum* **2**:
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S.A., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., et al. (2008) The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of bacteriology* **190**: 6881–93.
- Rasko, D.A., Webster, D.R., Sahl, J.W., Bashir, A., Boisen, N., Scheutz, F., et al. (2011) Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic–Uremic Syndrome in Germany. *New England Journal of Medicine* **365**: 709–717.
- van Regenmortel, M.H., Mayo, M.A., Fauquet, C.M., and Maniloff, J. (2000) Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Archives of virology* **145**: 2227–32.
- Ripp, S., Ogunseitan, O.A., and Miller, R. V (1994) Transduction of a freshwater microbial community by a new *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage, UT1. *Molecular ecology* **3**: 121–6.
- Ritchie DF; Klos EJ (1977) Isolation of *Erwinia amylovora* bacteriophages from aerial parts of apple trees. *Phytopathology* **67**: 101–104.
- Ritchie, J.M., Wagner, P.L., Acheson, D.W.K., and Waldor, M.K. (2003) Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Applied and environmental microbiology* **69**: 1059–66.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahl, D.F., Jacoby, G.A., and Hooper, D.C. (2006) qnr Prevalence in Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 2872–2874.
- Rode, T.M., Axelsson, L., Granum, P.E., Heir, E., Holck, A., and L’abée-Lund, T.M. (2011) High stability of Stx2 phage in food and under food-processing conditions. *Applied and environmental microbiology* **77**: 5336–41.
- Rodríguez-Baño, J., Alcalá, J.C., Cisneros, J.M., Grill, F., Oliver, A., Horcajada, J.P., et al. (2008) Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Archives of internal medicine* **168**: 1897–902.
- Rooks, D.J., Libberton, B., Woodward, M.J., Allison, H.E., and McCarthy, A.J. (2012) Development and application of a method for the purification of free shigatoxigenic bacteriophage from environmental samples. *Journal of microbiological methods* **91**: 240–5.
- Rooks, D.J., Yan, Y., McDonald, J.E., Woodward, M.J., McCarthy, A.J., and Allison, H.E. (2010) Development and validation of a qPCR-based method for quantifying Shiga toxin-encoding and

- other lambdoid bacteriophages. *Environmental microbiology* **12**: 1194–204.
- Rosario, K., Nilsson, C., Lim, Y.W., Ruan, Y., and Breitbart, M. (2009) Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environmental microbiology* **11**: 2806–20.
- Ross, J. and Topp, E. (2015) Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Bacteriophage following Soil Fertilization with Dairy Manure or Municipal Biosolids, and Evidence for Potential Transduction. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 7905–7913.
- Salyers, A., Gupta, A., and Wang, Y. (2004) Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology* **12**: 412–416.
- Samadder, P., Xicohtencatl-Cortes, J., Saldaña, Z., Jordan, D., Tarr, P.I., Kaper, J.B., and Girón, J.A. (2009) The Escherichia coli ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic E. coli O157:H7. *Environmental microbiology* **11**: 1815–26.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R. V, Widdowson, M.-A., Roy, S.L., et al. (2011) Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging infectious diseases* **17**: 7–15.
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., et al. (2012) Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* **50**: 2951–2963.
- Schmidt, H., Bielaszewska, M., and 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. *Applied and environmental microbiology* **65**: 3855–61.
- Schmieger, H. and Schicklmaier, P. (1999) Transduction of multiple drug resistance of Salmonella enterica serovar typhimurium DT104. *FEMS microbiology letters* **170**: 251–6.
- Schroeder, G.N. and Hilbi, H. (2008) Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clinical microbiology reviews* **21**: 134–56.
- Seidu, R., Abubakari, A., Dennis, I.A., Heistad, A., Stenstrom, T.A., Larbi, J.A., and Abaidoo, R.C. (2015) A probabilistic assessment of the contribution of wastewater-irrigated lettuce to Escherichia coli O157:H7 infection risk and disease burden in Kumasi, Ghana. *Journal of water and health* **13**: 217–29.
- Semenov, A. and Franz, E. (2008) Estimating the stability of Escherichia coli O157: H7 survival in manure-amended soils with different management histories. *Environmental Microbiology* **10**: 1450–9.
- Semenov, A. V, Franz, E., van Overbeek, L., Termorshuizen, A.J., and van Bruggen, A.H.C. (2008) Estimating the stability of Escherichia coli O157:H7 survival in manure-amended soils with different management histories. *Environmental microbiology* **10**: 1450–9.
- Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J., Jofre, J., and Muniesa, M. (2006) Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Molecular Biology* **7**: 31.
- Serra-Moreno, R., Jofre, J., and Muniesa, M. (2007) Insertion site occupancy by stx2 bacteriophages

- depends on the locus availability of the host strain chromosome. *Journal of bacteriology* **189**: 6645–54.
- Serra-Moreno, R., Jofre, J., and Muniesa, M. (2008) The CI Repressors of Shiga Toxin-Converting Prophages Are Involved in Coinfection of *Escherichia coli* Strains, Which Causes a Down Regulation in the Production of Shiga Toxin 2. *Journal of Bacteriology* **190**: 4722–4735.
- Sharapov, U., Wendel, A., Davis, J., Keene, W., Farrar, J., Sodha, S., et al. (2016) Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach: United States, 2006. *Journal of Food Protection* **79**: 2024–2030.
- Shimizu, T., Kawakami, S., Sato, T., Sasaki, T., Higashide, M., Hamabata, T., et al. (2007) The serine 31 residue of the B subunit of Shiga toxin 2 is essential for secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **75**: 2189–200.
- Small, C.-L.N., Reid-Yu, S.A., McPhee, J.B., and Coombes, B.K. (2013) Persistent infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis. *Nature Communications* **4**: 1957.
- Snedeker, K.G., Shaw, D.J., Locking, M.E., and Prescott, R.J. (2009) Primary and secondary cases in *Escherichia coli* O157 outbreaks: a statistical analysis. *BMC infectious diseases* **9**: 144.
- Solioz, M., Yen, H.C., and Marris, B. (1975) Release and uptake of gene transfer agent by *Rhodopseudomonas capsulata*. *Journal of bacteriology* **123**: 651–7.
- Solomon, E.B., Yaron, S., and Matthews, K.R. (2002) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and environmental microbiology* **68**: 397–400.
- Sommer, M.O.A., Dantas, G., and Church, G.M. (2009) Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science (New York, N.Y.)* **325**: 1128–1131.
- Soysal, N., Mariani-Kurkdjian, P., Smail, Y., Liguori, S., Gouali, M., Loukiadis, E., et al. (2016) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hybrid Pathotype O80:H2 as a New Therapeutic Challenge. *Emerging infectious diseases* **22**: 1604–12.
- Spano, A.J., Chen, F.S., Goodman, B.E., Sabat, A.E., Simon, M.N., Wall, J.S., et al. (2007) In vitro assembly of a prohead-like structure of the *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent. *Virology* **364**: 95–102.
- Spricigo, D.A., Bardina, C., Cortés, P., and Llagostera, M. (2013) Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology* **165**: 169–174.
- Stanczak-Mrozek, K.I., Laing, K.G., and Lindsay, J.A. (2017) Resistance gene transfer: induction of transducing phage by sub-inhibitory concentrations of antimicrobials is not correlated to induction of lytic phage. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **72**: 1624–1631.
- Stanton, T.B. (2007) Prophage-like gene transfer agents-novel mechanisms of gene exchange for *Methanococcus*, *Desulfovibrio*, *Brachyspira*, and *Rhodobacter* species. *Anaerobe* **13**: 43–9.
- Steyert, S.R., Sahl, J.W., Fraser, C.M., Teel, L.D., Scheutz, F., and Rasko, D.A. (2012) Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2**: 133.

- St-Pierre, F. and Endy, D. (2008) Determination of cell fate selection during phage lambda infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 20705–20710.
- Strachan, N.J.C., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M.S., and Ogden, I.D. (2006) Escherichia coli O157: Burger bug or environmental pathogen? *International Journal of Food Microbiology* **112**: 129–137.
- Summers, W.C. (2001) Bacteriophage Therapy. *Annual Review of Microbiology* **55**: 437–451.
- Taneja, N., Singh, M., Rao, P., Biswal, M., Priya, S., Chander, R., and Sharma, M. (2011) Fecal contamination of drinking water supplies in and around Chandigarh and correlation with acute gastroenteritis. *The Journal of communicable diseases* **43**: 193–9.
- Tanji, Y., Mizoguchi, K., Yoichi, M., Morita, M., Kijima, N., Kator, H., and Unno, H. (2003) Seasonal change and fate of coliphages infected to Escherichia coli O157:H7 in a wastewater treatment plant. *Water research* **37**: 1136–42.
- Tarr, P.I., Gordon, C.A., and Chandler, W.L. (2005) Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet* **365**: 1073–1086.
- Tejedor, C., Foulds, J., and Zasloff, M. (1982) Bacteriophages in sputum of patients with bronchopulmonary Pseudomonas infections. *Infection and immunity* **36**: 440–1.
- Tesh, V.L. (2012) Activation of cell stress response pathways by Shiga toxins. *Cellular Microbiology* **14**: 1–9.
- Tinsley, C.R., Bille, E., and Nassif, X. (2006) Bacteriophages and pathogenicity: more than just providing a toxin? *Microbes and Infection* **8**: 1365–1371.
- 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 Escherichia coli O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14941–6.
- Touchon, M., Moura de Sousa, J.A., and Rocha, E.P. (2017) Embracing the enemy: the diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. *Current opinion in microbiology* **38**: 66–73.
- Tyler, H.L. and Triplett, E.W. (2008) Plants as a Habitat for Beneficial and/or Human Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 53–73.
- Tyler, J.S., Mills, M.J., and Friedman, D.I. (2004) The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *Journal of bacteriology* **186**: 7670–9.
- Ubukata, K., Konno, M., and Fujii, R. (1975) Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from Streptococcus pyogenes. *The Journal of antibiotics* **28**: 681–8.
- Valverde, A., Grill, F., Coque, T.M., Pintado, V., Baquero, F., Cantón, R., and Cobo, J. (2008) High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *Journal of clinical microbiology* **46**: 2796–9.
- Varga, M., Kuntová, L., Pantůček, R., Mašlaňová, I., Růžičková, V., and Doškař, J. (2012) Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus USA300 clone. *FEMS microbiology letters* **332**: 146–52.
- Wagner, P.L., Livny, J., Neely, M.N., Acheson, D.W.K., Friedman, D.I., and Waldor, M.K. (2002) Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **44**: 957–70.
- Wagner, P.L., Neely, M.N., Zhang, X., Acheson, D.W., Waldor, M.K., and Friedman, D.I. (2001) Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *Journal of bacteriology* **183**: 2081–5.
- Weinbauer, M.G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews* **28**: 127–81.
- Wellington, E.M., Boxall, A.B., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., et al. (2013) The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases* **13**: 155–165.
- Westbye, A.B., Leung, M.M., Florizone, S.M., Taylor, T.A., Johnson, J.A., Fogg, P.C., and Beatty, J.T. (2013) Phosphate concentration and the putative sensor kinase protein CckA modulate cell lysis and release of the *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent. *Journal of bacteriology* **195**: 5025–40.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6578–83.
- Wieler, L.H., Semmler, T., Eichhorn, I., Antao, E.M., Kinnemann, B., Geue, L., et al. (2011) No evidence of the Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area. *Gut pathogens* **3**: 17.
- Willi K1, Sandmeier H, Kulik EM, M.J. (1997) Transduction of antibiotic resistance markers among *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains by temperate bacteriophages Aa phi 23. - PubMed - NCBI. *Cell Mol Life Sci.* 904–10.
- Williams, A.P., McGregor, K.A., Killham, K., and Jones, D.L. (2008) Persistence and metabolic activity of *Escherichia coli* O157:H7 in farm animal faeces. *FEMS microbiology letters* **287**: 168–73.
- Von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., Van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., Van Alphen, L.B., et al. (2016) Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1–10.
- Wommack, K.E. and Colwell, R.R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **64**: 69–114.
- Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., and Tarr, P.I. (2000) The Risk of the Hemolytic–Uremic Syndrome after Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *New England Journal of Medicine* **342**: 1930–1936.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M.A., Jordan, D.M., Francetic, O., Kaper, J.B., et al. (2007) Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Investigation* **117**: 3519–3529.
- Yamamoto, T., Kojio, S., Taneike, I., Nakagawa, S., Iwakura, N., and Wakisaka-Saito, N. (2003) 60Co irradiation of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* induces Stx phage. *FEMS microbiology letters* **222**: 115–21.

- Yan, Y., Shi, Y., Cao, D., Meng, X., Xia, L., and 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. *Current microbiology* **62**: 458–64.
- Yang, H., Byelashov, O.A., Geornaras, I., Goodridge, L.D., Nightingale, K.K., Belk, K.E., et al. (2010) Presence of antibiotic-resistant commensal bacteria in samples from agricultural, city, and national park environments evaluated by standard culture and real-time PCR methods. *Canadian Journal of Microbiology* **56**: 761–770.
- Yao, Z., Yang, L., Wang, H., Wu, J., and Xu, J. (2015) Fate of *Escherichia coli* O157: H7 in agricultural soils amended with different organic fertilizers. *Journal of Hazardous Materials* **296**: 30–36.
- Yue, W.-F., Du, M., and Zhu, M.-J. (2012) High temperature in combination with UV irradiation enhances horizontal transfer of stx2 gene from *E. coli* O157:H7 to non-pathogenic *E. coli*. *PloS one* **7**: e31308.
- Zeng, L., Skinner, S.O., Zong, C., Sippy, J., Feiss, M., and Golding, I. (2010) Decision making at a subcellular level determines the outcome of bacteriophage infection. *Cell* **141**: 682–91.
- Zhao, Y., Wang, K., Budinoff, C., Buchan, A., Lang, A., Jiao, N., and Chen, F. (2009) Gene transfer agent (GTA) genes reveal diverse and dynamic *Roseobacter* and *Rhodobacter* populations in the Chesapeake Bay. *The ISME journal* **3**: 364–73.

8. ANEXOS



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

Alexandre Martinez-Castillo,^a Pablo Quirós,^a Ferran Navarro,^b Elisenda Miró,^b Maite Muniesa^a

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

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 2.6×10^4 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*₂) (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

EDITORIAL

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Spread of bacterial genomes in packaged particles



Pablo Quirós¹, Maryury Brown-Jaque¹ & Maite Muniesa^{*1}

First draft submitted: 5 November 2015; Accepted for publication: 24 November 2015; Published online: 5 February 2016

Bacteria can evolve through mutations that can be transferred vertically, to the progeny, or horizontally, by acquisition or loss of genomic contents. When considering the exchange of the determinants of virulence or antimicrobial resistance genes between bacterial pathogens that can cause an infection, horizontal gene transfer becomes a major concern for modern medicine. Horizontal gene transfer is mediated by mobile genetic elements such as plasmids, transposons, integrative conjugative elements, integrons, mobile pathogenicity islands and bacteriophages.

In 1974, studies focusing on the marine bacterium *Rhodobacter capsulatus* reported extracellular elements that were capable of transferring genetic traits between strains [1]. Those elements were called gene transfer agents (GTAs) and showed a high frequency of transfer of antibiotic resistance genes; three orders of magnitude higher than any other known mechanism of genetic transfer [2]. GTAs are particles that resemble a bacteriophage capsid

(sometimes tailed). The genes that encode for the capsid are located in the ‘donor’ bacteria. Once formed upon entry into the stationary phase, the capsid packages DNA fragments from the donor bacteria. GTAs are subsequently released from the cells through cell lysis and can transfer their DNA content to other recipient bacteria [3].

Despite their resemblance to bacteriophages, GTAs display important differences. For instance, the donor bacterial cell possesses genes that encode capsid structural proteins and proteins involved in DNA packaging, but lack other bacteriophage genes. GTA genes are only present in the donor bacteria and are not transferred to the recipient bacteria. When compared with generalized transduction mediated by phages, the main difference is that GTA transfer does not require previous infection by a phage particle [3], because the information for DNA packaging by GTAs is already present in the bacteria. Theoretically, any bacterial gene may be transferred by GTAs, and the only

KEYWORDS

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

“Bacteria can evolve through mutations that can be transferred vertically, to the progeny, or horizontally, by acquisition or loss of genomic contents.”

¹Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 645, Annex, Floor 0, 08028 Barcelona, Spain

*Author for correspondence: Tel.: +34 93 403 9386; Fax: +34 93 403 9047; mmuniesa@ub.edu

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Tracking bacterial virulence: global modulators as indicators

Alejandro Prieto¹, Imanol Urcola², Jorge Blanco³, Ghizlane Dahbi³, Maite Muniesa¹, Pablo Quirós¹, Linda Falgenhauer⁴, Trinad Chakraborty⁴, Mário Hüttener² & Antonio Juárez^{1,2}

Received: 01 December 2015

Accepted: 26 April 2016

Published: 12 May 2016

The genomes of Gram-negative bacteria encode paralogues and/or orthologues of global modulators. The nucleoid-associated H-NS and Hha proteins are an example: several enterobacteria such as *Escherichia coli* or *Salmonella* harbor H-NS, Hha and their corresponding paralogues, StpA and YdgT proteins, respectively. Remarkably, the genome of the pathogenic enteroaggregative *E. coli* strain O42 encodes, in addition to the *hha* and *ydgT* genes, two additional *hha* paralogues, *hha2* and *hha3*. We show in this report that there exists a strong correlation between the presence of these paralogues and the virulence phenotype of several *E. coli* strains. *hha2* and *hha3* predominate in some groups of intestinal pathogenic *E. coli* strains (enteroaggregative and shiga toxin-producing isolates), as well as in the widely distributed extraintestinal ST131 isolates. Because of the relationship between the presence of *hha2/hha3* and some virulence factors, we have been able to provide evidence for Hha2/Hha3 modulating the expression of the antigen 43 pathogenic determinants. We show that tracking global modulators or their paralogues/orthologues can be a new strategy to identify bacterial pathogenic clones and propose PCR amplification of *hha2* and *hha3* as a virulence indicator in environmental and clinical *E. coli* isolates.

Epidemiology of bacterial infections is in some instances understood because of the distribution of virulence genes in clinical isolates¹. *Escherichia coli* virulent strains are a good example for that. This microorganism represents an outstanding example of genetic plasticity² and of how the mechanisms driving horizontal gene transfer (HGT) impact its ability to colonize several niches, including human organs and tissues. Whereas several *E. coli* isolates are non-pathogenic and some of them belong to the human intestinal flora, many other strains express virulence determinants, which allow them to proliferate and cause disease. Pathogenic *E. coli* isolates are classified in pathotypes, which are defined by a combination of virulence factors, phenotype and clinical association³. However, the distribution of virulence factors is not strictly associated to each pathotype. A well-known example is *E. coli* strain O104:H4 that caused a large outbreak of bloody diarrhea with a high prevalence of associated hemolytic-uremic syndrome (HUS) in Germany in 2011⁴. This newly emerged strain caused the highest frequency of HUS and death ever recorded. The O104:H4 outbreak strain was classified as an enteroaggregative *E. coli* (EAEC) because of its pattern of adherence to cultured cells and the presence of a plasmid (pAA) that encoded the fimbriae that mediate this type of adherence⁵. In contrast to typical EAEC strains, the outbreak strain contains a prophage encoding the Shiga toxin⁶, which is a well-studied virulence determinant usually expressed by a different *E. coli* pathotype, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). Remarkably, the strain contains an unusual combination of genes that accounts for its pathogenicity and its extensive antibiotic resistance profile against a variety of beta-lactams^{5,7}. Pathogenic bacterial isolates containing different combinations of genes justify that identification of specific pathogenic lineages may require a complex analysis of the presence of a large set of virulence traits.

In enteric bacteria, regulation of virulence determinants is dependent upon, among other global regulators, the nucleoid-associated protein H-NS. This protein is widespread in Gram-negative bacteria and has been best studied in *E. coli* and related genera. H-NS plays a dual role, both as an architectural protein that contributes to the nucleoid structure and as a global modulator of gene expression (for a review see⁸). The *E. coli hns* gene encodes a

¹Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda, Diagonal 643, 08028, Barcelona, Spain. ²Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), Baldiri Reixach 15-21, 08028, Barcelona, Spain. ³Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología e Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, Spain. ⁴Institute of Medical Microbiology, Justus-Liebig University, Schubertstrasse 81, 35392 Giessen, Germany and German Center for Infection Research DZIF, Partner site Giessen-Marburg-Langen, Campus Giessen, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.J. (email: ajuarez@ub.edu) or M.H. (email: mhuttener@me.com)

8.2. ANEXO 2: MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES.

2.1 Medios de cultivo

Caldo LB (Luria-Bertani):

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 1 L H₂O destilada

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

LB ss (semisólido):

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 7 g agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

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

LB agar:

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 15 g agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

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

Caldo MSB (Modified Scholtens Broth):

- 10 g peptone
- 3 g extracto de levadura
- 12 g extracto de carne
- 3 g NaCl
- 5 ml Na₂CO₃ (15%)
- 0,3 ml MgCl₂ (1M)
- 1 L H₂O destilada

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

MSA ss (semisólido):

- 10 g peptone
- 3 g extracto de levadura
- 12 g extracto de carne
- 3 g NaCl
- 5 ml Na₂CO₃ (15%)
- 0,3 ml MgCl₂ (1M)
- 7,6 g agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

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

- 6 ml CaCl₂ (1M)

MSA:

- 10 g peptone
- 3 g extracto de levadura
- 12 g extracto de carne
- 3 g NaCl
- 5 ml Na₂CO₃ (15%)
- 0,3 ml MgCl₂ (1M)
- 15 g agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

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

- 6 ml CaCl₂ (1M)

Chromocult® (Merck):

- 26,5 g chromocult™
- 1 L H₂O destilada

Disolver con calor y suave agitación. Cuando el agua empiece a hervir, dejar enfriar hasta los 45-50°C y añadir el suplemento. Dispensar en placas de Petri y guardar a 4°C.

SOB (Super Optimal broth):

- 20 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 0,5 g NaCl
- 10 ml KCl 250 mM
- 1 L H₂O destilada
- Ajustar a pH 7

Esterilizar a 121°C 15 min.

- 5 ml MgCl_2 2M (estéril), guardar a 4°C.

SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression):

- 20 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 0,5 g NaCl
- 10 ml KCl 250 mM
- 1 L H_2O destilada
- Ajustar a pH 7

Esterilizar a 121°C 15 min.

- 5 ml MgCl_2 2M (estéril), guardar a 4°C.
- Añadir 20 ml de glucosa 1M por litro de SOB y guardar a 4°C.

2.2 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_2O bd
- Ajustar el pH a 7,1-7,2.

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

Tampón para fagos:

- 3,5 g Na_2HPO_4
- 1,5 g KH_2PO_4
- 2,5 g NaCl
- 500 ml de H_2O destilada

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

- 5 ml MgSO_4 (0,1M)
- 5 ml CaCl_2 (0,01M)

Tampón de desnaturalización:

- 20 g NaOH
- 87,66 g NaCl
- 1 L H_2O bidestilada (H_2O bd) estéril

No esterilizar, mantener a temperatura ambiente.

Tampón de neutralización:

- 87,66 g NaCl
- 500 ml Tris HCl (1M, pH 7,4)
- 1 L de agua destilada

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 H₂O bd

No esterilizar, guardar a temperatura ambiente.

Tampón 2 de hibridación:

- 5 g agente bloqueante (Roche®)
- 1 L H₂O bd

Disolver con calor y agitación, y guardar a -20°C.

Tampón 3 de hibridación:

- 100 ml Tris HCl (1M, pH 9,5)
- 100 ml NaCl (1M)
- 50 ml MgCl₂ (1M)
- 750 ml H₂O bd

No esterilizar, preparar inmediatamente antes de su uso.

Tampón de anticuerpo anti-digoxigenina:

- 10 µl de anticuerpo (Roche®)
- 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") al 10%
- 2 g de agente bloqueante (Roche®)
- 145 ml H₂O bd

Disolver con calor, en agitación y guardar a -20°C.

Tampón de hibridación:

- 50 ml tampón de prehibridación
- 10 μ l sonda marcada con dUTP (Roche®)

Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a -20°C.

Tampón SSC 20X:

- 175,32 g cloruro sódico
- 88,23 g citrato sódico
- 1 L de H₂O bd

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

Tampón SDS 10%:

- 10 g SDS
- 100 ml H₂O bd

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

N-lauryl sarcosina 10%:

- 10 g N-lauryl sarcosina
- 100 ml H₂O bd

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

2X SSC + 0,1% SDS:

- 50 ml SSC 20X
- 5 ml SDS 10%
- 445 ml H₂O bd

Guardar a temperatura ambiente.

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

- 1 ml SSC 20X
- 5 ml SDS 10%
- 494 ml H₂O bd

Guardar a temperatura ambiente.

2X SSC + 1% SDS:

- 50 ml SSC 20X

- 50 ml SDS 10%
- 400 ml H₂O bd

Guarda a temperatura ambiente.

Tritón NaOH:

- 0,2 ml tritón X 100
- 100 ml hidróxido de sodio 0,5N

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

Tampón de lavado:

- 3 g Tween 20
- 1 L de tampón 1 de hibridación

Agitar y guardar a temperatura ambiente.

Mitomicina C:

- 0,5 mg mitomicina C
- 1 ml H₂O bd estéril

Disolver la mitomicina y conservar a 4°C en oscuridad.

TBE (Tris Boric EDTA Buffer) 10X:

- 109 g Tris base
- 55,6 g ácido bórico
- 9,2 g EDTA
- Hasta 1L H₂O

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

TBE 1X:

- 100 ml TBE 10X
- 900 ml H₂O bd estéril

Guardar a temperatura ambiente.

Gel de agarosa:

- 150 ml TBE 1X
- Agarosa al porcentaje adecuado (0,8%, 1%, 2%...) dependiendo del tamaño del fragmento de ADN

Calentar en el microondas y agitar varias veces durante el calentamiento evitando la ebullición.

Dye buffer o tampón de carga:

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

Guardar a -20°C.

Bromuro de etidio:

- 200 µl de solución (1% en p/v) de bromuro de etidio (Merck®)
- 1 L H₂O bd

ADNasa:

- 10 mg ADNasa
- 1 ml H₂O bd estéril

Una vez disuelto, conservar a -20°C.

Proteinasa K:

- 20 mg proteinasa k
- 1 ml de H₂O bd estéril

Una vez disuelto, conservar a -20°C.

Tampón proteinasa K:

- 2 ml Tris HCl 1M pH 8
- 2 ml EDTA 0,5 M pH 8
- 10 ml SDS 10%
- Enrasar a 100 ml H₂O bd

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

Acetato sódico 3 molar:

- 24,6 g acetato sódico
- Enrasar a 100 ml H₂O bd
- Ajustar el pH a 5

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

Etanol 70%:

- 70 ml etanol 100%
- 30 ml H₂O bd estéril

Guardar a temperatura ambiente sin esterilizar.

Tampón de lavado (membranas de diálisis):

- 20 g Na₂CO₃
- 5 ml EDTA 0,2 M (pH 8)
- 995 ml H₂O bd estéril

Preparar justo antes de usar.

Tampón EDTA (membranas de diálisis):

- 5 ml EDTA 0,2 M (pH 8)
- 995 ml de H₂O bd estéril

Preparar justo antes de usar.

Tampón de diálisis para gradientes de CsCl:

- 24.22 g Tris
- 0,14 g EDTA
- Enrasar a 1 L H₂O bd
- Ajustar a pH 8

Disolver por agitación, preparar justo antes de usar.

Molibdato de amonio al 2%:

- 0,2 mg de molibdato de amonio
- 10 ml H₂O bd estéril
- Ajustar a pH 7

Agitar y guardar a 4°C en oscuridad.

8.3 ANEXO 3: PROTOCOLOS REALIZADOS

3.1 Reacción de PCR convencional:

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó la siguiente mezcla.

Componente	Volumen (μ l)
Polimerasa (Dream Taq Green PCR Master Mix, Fermentas®)	12,5
Cebador Up 30 μ M	0,5
Cebador Lp 30 μ M	0,5
H ₂ O bidestilada (H ₂ O bd) estéril	10,5
ADN	1
Volumen final	25

El programa de tiempos y temperaturas fue seleccionado en función de las características de los cebadores y la longitud del fragmento de ADN (30s por cada 500 pares de bases).

3.2 Secuenciación Sanger de muestras “premixed”:

Para la realización de este protocolo de secuenciación han de llevarse a cabo los siguientes pasos.

- 1) Mezclar el ADN (100 ng por 1 kb de ADN molde) con el cebador (3,2 - 5 pmoles, siendo μ M equivalente a pmol/ μ l) en un tubo de PCR.
- 2) Dejar el tubo abierto y secar en un termociclador a 80°C hasta la total evaporación de la muestra.
- 3) Tapar las muestras desecadas y guardar a 4°C hasta su procesamiento.

3.3 PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real:

Se diseñaron dos cebadores y una sonda TaqMan (situada entre ambos cebadores) específicos del gen que queremos estudiar. Es importante que estos se encuentren en una región del ADN lo suficientemente conservada.

En la presente tesis, se diseñaron cebadores y sondas para los genes: *stx*₁, *stx*₂, *gfp*, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *qnrA*, *qnrS*, *armA* y *mecA*. En todos los casos se utilizaron sondas TaqMan® con fluorocromo FAM. En cuanto al diseño, se buscaron las secuencias de las variantes de cada gen utilizando la base de datos de Pubmed. Estas secuencias se alinearon para conseguir una secuencia consenso con el programa BioEdit. A partir de la secuencia consenso se utilizó el programa Primer Express para encontrar el lugar idóneo de cebadores y sonda, siguiendo las recomendaciones que dicta el fabricante (Life Technologies). Por último se eligieron adecuadamente dos cebadores externos a

esta secuencia (un cebador a cada lado) para obtener por PCR convencional un amplímero que fue clonado en el vector pGEM a fin de generar un estándar con el que realizar una recta patrón (explicado en el siguiente punto), que permite la cuantificación absoluta del gen. Algunas de las reacciones utilizadas no se diseñaron en esta tesis, sino que se obtuvieron de referencias bibliográficas tal como se indica en la tabla del Anexo.

Para las reacciones de PCR cuantitativa se utilizó de siguiente mezcla.

Componente	Volumen (μ l)		
Mix de cebadores y sonda Taqman [®]	1	1	1
TaqMan [®] Enviromental Master Mix 2.0	10	10	10
ADN	9	4	1
H2O bd estéril	0	5	8
Volumen Final	20		

En función de la pureza y de la concentración de ADN de las muestras, se eligieron uno de los tres volúmenes y reacciones siguiendo los siguientes criterios.

- En muestras “limpias” donde no se esperaba presencia de inhibidores y con una concentración de ADN normal-baja se eligió la reacción de la primera columna.
- En muestras aparentemente “sucias” donde se esperaba elevada presencia de inhibidores de la reacción, o muestras donde hubiera una concentración muy alta de ADN que pudieran también inhibir la reacción, se optó por la tercera columna.
- En casos intermedios, la columna del medio fué la opción seleccionada.

*En muchos tipos de muestras es complicado saber esto de antemano, por lo que es aconsejable realizar siempre una primera prueba con las mezclas de la primera columna y en función de los resultados repetir con la mezcla de reacción más conveniente.

3.4 Diseño de la qPCR específica para el gen *stx*₁:

Dado que el objetivo en este caso era conseguir una qPCR que englobara las variantes descritas de *stx*₁ (a, c, d, el primer paso fue buscar un alto número de secuencias de cada variante y lograr una secuencia consenso común a todas con el programa BioEdit.

A continuación, gracias al programa Primer Express 3.0.1 se determinó el lugar idóneo para la sonda y los cebadores externos a esta. Una vez obtenido el fragmento que luego se iba a cuantificar, se diseñaron dos cebadores externos a este fragmento para conseguir por PCR el inserto a clonar.

Una vez obtenido el inserto, para obtener la recta patrón se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- I. Se clonó el inserto stx_1 en el vector pGEM-T Easy (Promega, Barcelona, Spain). Se usaron células competentes (*E. coli* DH5 α) y se realizó el protocolo de transformación descrito posteriormente.
- II. Extracción y purificación del plásmido: se realizó la extracción del vector pGEM con el fragmento stx_1 insertado según el protocolo descrito posteriormente. Para comprobar que la purificación se había realizado correctamente se miró la concentración en el NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies. Thermoscientifics. Wilmington. USA) y también se realizó una amplificación por PCR seguida de electroforesis gel de agarosa al 1% con 5 μ l del producto de purificación.
- III. Se realizó un banco de diluciones decimales seriadas (desde el purificado directo hasta la dilución -10) y se hizo una Real Time PCR con éstas (5 o 6 réplicas de cada dilución) y el control negativo (H₂O bd) estéril).
- IV. Con los resultados obtenidos de los estándares se realizaron los cálculos y se elaboró la recta patrón. El número de copias genómicas (CG) por μ l se calculó a partir de la ecuación de la recta estándar, asumiendo que la masa media de una molécula son 660Da (g/mol). El cálculo se realizó usando la siguiente formula:

$$\text{Copias genómicas (CG)/}\mu\text{l muestra} = \left(\frac{X \text{ (ng/}\mu\text{l)}}{P_{\text{pGEM::gen}} \times 660 \times 10^9 \text{ (ng/mol)}} \right) \times 6.023 \times 10^{23}$$

X: Concentración de ADN del purificado pGEM-T-Easy:: stx_1 (ng/ μ l)

$P_{\text{pGEM::gen}}$: Longitud del plásmido con el inserto (pb)

6.023×10^{23} : Número de Avogadro

- V. Utilizando esta fórmula se calculó que en 1 μ l de stock plásmido- stx_1 , habría $9,06 \times 10^{10}$ CG.

3.5 Transformación y clonaje en el plásmido pGEM-T Easy (Promega):

Tras la amplificación por PCR convencional del gen o inserto que se quiere clonar se realizó una electroforesis de dicho fragmento de ADN en un gel de agarosa. Tras revelar el gel, y sólo tras confirmar una sola banda correspondiente al fragmento amplificado (mismo tamaño) se realizó una purificación por producto de PCR (mediante el kit Qiaquick PCR Purification Kit, Qiagen). Si se obtuvo más de una banda, debido a amplificación inespecífica de otros fragmentos, la banda correspondiente al fragmento amplificado fue recortada del gel de agarosa mediante un escalpelo estéril y fue purificada con un kit específico al efecto (Qiaquick Gel Extraction kit) según las instrucciones del fabricante (Qiagen), que se describen en este anexo. El ADN purificado resultante conteniendo gen o inserto, se añadió a la mezcla de ligación:

Reactivos	Volumen (μ l)
2x tampón de ligación	5
Vector pGEM-T-easy	1

ADN purificado	2
ADN ligasa T4	1
H ₂ O bd estéril	1
Volumen final	10

La reacción se homogenizó y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se conservó a 4°C para usarla a continuación.

El siguiente paso fue realizar la clonación del gen o inserto en una *E. coli* DH5α:

- A partir de un cultivo en caldo LB de *E. coli* DH5α en fase estacionaria de crecimiento, se realizó una dilución 1:10 en LB y se incubó en agitación a 37°C.
- Cuando la densidad óptica (DO) alcanzó una absorbancia de 0,3-0,5 se detuvo el crecimiento del cultivo en fase exponencial dejándolo 10 minutos en hielo.
- Se centrifugó a 3000xg durante 5 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 400 µl de H₂O bd estéril fría.
- Se realizó una centrifugación a 16000xg durante 10 segundos para eliminar el sobrenadante y se volvió a añadir 400 µl de H₂O bd estéril fría. Esta operación de lavado se repitió de 4 a 5 veces.
- Tras el último lavado se resuspendió el pellet celular en 100 µl de H₂O bd fría y se añadió la mezcla de ligación.
- El cultivo de *E. coli* DH5α junto con la mezcla de ligación se introdujo en una cubeta de electroporación fría y se procedió a electroporar (2.5 kV, 25 F, 200Ω).
- Tras la electroporación, se inoculó la mezcla en 3 ml de LB que se incubaron a 37°C en estático durante 2 horas.
- 100 µl de mezcla se inoculó en diversas placas de LB ampicilina₁₀₀ que se incubaron a 37°C durante 18h.
- Las colonias crecidas en presencia del antibiótico, susceptibles de haber incorporado el pGEM junto con el fragmento de ADN clonado, y en caso de haberlo incorporado para saber la orientación del inserto, fueron verificadas. Para ello se realizó una lisis celular a 90°C durante 5 minutos y posterior centrifugación a 16000xg durante 5 minutos. El sobrenadante conteniendo ADN se usó como molde en 2 reacciones de PCR utilizando el cebador Up de pGEM con el cebador Lp del inserto y el cebador Up de pGEM con el cebador Up del inserto. Una de las dos reacciones tuvo que dar positiva. La presencia del inserto correcto se confirmó entonces por secuenciación Sanger del amplímero obtenido usando los mismos cebadores.

3.6 Extracción y purificación de plásmidos (PureLink® HiPure Plasmid Midiprep kit, Invitrogen)

Para ello se siguieron las instrucciones del fabricante que se indican a continuación:

- 1) Añadir 10 ml de "Equilibration Buffer" (EQ1) a la columna Midi. Dejar que el buffer atraviese la columna por gravedad.
- 2) Centrifugar a 3000xg durante 10 minutos 50 ml de cultivo en fase estacionaria tras 18h de crecimiento en agitación a 37°C (o a 30°C en el caso del vector pKD46). Descartar el sobrenadante.
- 3) Añadir 4 ml de "Resuspension Buffer" (R3) al precipitado bacteriano y resuspender bien.
- 4) Añadir 4 ml de "Lysis Buffer" (L7) y mezclar invirtiendo el tubo 5 veces. No agitar. Dejar a temperatura ambiente 5 minutos.
- 5) Añadir 4 ml de "Precipitation Buffer" (N3). Invertir el tubo hasta que la mezcla sea homogénea. No agitar. Centrifugar el lisado a 12000xg 10 minutos.
- 6) Equilibrar la columna. Poner el sobrenadante en la columna equilibrada anteriormente. Dejar que atraviese la columna por gravedad.
- 7) Añadir 10 ml de "Wash Buffer" 2 veces en la columna. Descartar todo el Buffer que atraviese la columna.
- 8) Cambiar la columna a un nuevo tubo estéril. Añadir 5 ml de "Elution Buffer" (E4) a la columna. La solución que atraviese la columna por gravedad llevará el ADN plasmídico.
- 9) Descartar la columna y añadir 3,5 ml de isopropanol a la solución con el ADN plasmídico. Mezclar bien. Centrifugar a 12000xg durante 30 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante y añadir 3 ml de etanol 70%. Volver a centrifugar a 12000xg 5 minutos a 4°C. Descartar con cuidado el sobrenadante.
- 10) Dejar secar el precipitado de ADN y resuspender bien con 100 o 200 µl de "TE Buffer" (TE). Guardar el ADN plasmídico a -20°C.

3.7 Extracción de ADN total (QIAamp® DNA Blood Mini kit, Qiagen):

Para ello se siguieron las instrucciones del fabricante que se indican a continuación:

- 1) Se parte de un volumen de 200 µl de muestra.
- 2) Añadir 20 µl de proteinasa K (QIAGEN Protease) y 200 µl de tampón AL. Agitar con el vortex hasta que la solución sea homogénea.
- 3) Incubar a 56°C durante 10 min y hacer una centrifugación rápida a 16000xg 10 segundos para recuperar todo el volumen.
- 4) Añadir 200 µl de etanol 100% y mezclar bien.
- 5) Colocar la muestra en una columna (QIAamp Mini spin column) y centrifugar a 6000 xg durante 1 min. Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml.
- 6) Añadir 500 µl de tampón AW1 y centrifugar de nuevo 1 min a 6000 xg Volver a cambiar el tubo de 2 ml.
- 7) Añadir 500 µl de tampón AW2 y centrifugar 3 min a 6000xg.

- 8) Descartar el filtrado y centrifugar 1 min para eliminar los restos de tampón.
- 9) Colocar la columna en un nuevo tubo de 1,5 ml y añadir 200 µl de tampón AE o H₂O bd estéril.
- 10) Incubar 5 min a temperatura ambiente y centrifugar 1 min a 6000 xg para obtener el ADN bacteriano.

3.8 Extracción de ADN fágico:

El ADN fágico se extrajo de muestras muy diversas: muestras líquidas (agua de río, agua residual, inducciones fágicas...) y muestras sólidas (vegetales, carnes, heces...).

En el caso de las muestras líquidas se centrifugaron a 1500xg durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se filtró por filtros de 0,22 µm de baja adsorción proteica (Millipore®). En el caso de muestras sólidas, se homogenizaron con PBS o tampón de fago (1:5) durante dos minutos en el Masticator (IUL Instruments GmbH, Königswinter, Alemania) y el homogenizado resultante se centrifugó a 1500xg durante 10 minutos, posteriormente se filtró por filtros de 0,22 µm de baja adsorción proteica (Millipore®).

Una vez obtenida la fracción fágica de la muestra, se utilizaron 500 µl para realizar el protocolo:

- 1) Tratamiento con ADNasa: Se añadieron 20 µl de ADNasa (10 mg/ml) y se incubó 1h a 37°C. Después del tratamiento se cogió una alícuota (unos 20 µl) 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).
- 2) Se añadieron 10 µl de proteínasa K (20 µg/ml) y 0.25 ml de tampón proteínasa K. Incubación 1 h a 55°C.
- 3) Precipitación del ADN fágico. La muestra se mezcló en una proporción 1:1 v:v con fenol/cloroformo (1:1 v:v) en tubos de phase lock (5-Prime) y se centrifugaron a 16000xg durante 5 min. Se añadió cloroformo (1:1 v:v) al sobrenadante (en los mismos tubos). Se centrifugó de nuevo a 13000rpm 5 min.
- 4) 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.
- 5) El ADN precipitado se recogió (en eppendorfs) centrifugando 30 min a 16000xg a 4°C. Después se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 250 µl de etanol al 70%. Centrifugar 10 min a 16000xg.
- 6) 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 µl de H₂O bd.

3.9 Inducción de bacteriófagos a partir de cepas bacterianas

- 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, hasta alcanzar una DO_{600} entre 0.3-0.5.
- 2) Para inducir el ciclo lítico de los profagos que pueda contener la cepa, se añadió mitomicina C a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se incubó a oscuras a 37°C en un agitador orbital durante 18 h.
- 3) Al día siguiente se filtró el sobrenadante con filtros de PES de 0.22 μm de baja adsorción proteica (Millipore) para separar la fracción fágica de los restos celulares.

De esta manera, se obtuvo la suspensión de bacteriófagos.

En caso de ser necesario, esta suspensión fágica se purificó mediante pasos adicionales. Estos fueron un tratamiento con cloroformo (1:10 v:v) y agitación vigorosa durante 5 minutos para eliminar restos bacterianos y posibles vesículas de membrana externa. Tras el tratamiento, se centrifugó la suspensión a 11000xg durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Un segundo paso usado en los protocolos que requieren extracción posterior del ADN fágico fue un tratamiento con ADNasa I (10 mg/ml), como se indica en la sección de extracción de ADN fágico a fin de eliminar ADN no encapsidado.

3.10 Propagación de bacteriófagos en cultivo líquido:

Se realizó un cultivo conteniendo

- 1 ml de la suspensión fágica que se quiere propagar.
- 1 ml *E. coli* cepa WG5 (fue la más usada en esta tesis, aunque se puede usar otra cepa bacteriana).
- 8 ml de caldo LB.

El volumen final de 10 ml se homogenizó y se incubó a 37°C en agitación durante 18h. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó el cultivo a 1500xg durante 10 minutos y se filtró por filtros de 0,22 μm PES de baja adsorción proteica.

3.11 Test de la gota y titulación de fagos:

El test de la gota, tiene como finalidad determinar si los fagos presentes en una muestra son infectivos. Permite una evaluación rápida, aunque no permite cuantificarlos.

- 1) Se pone a crecer la cepa huésped en caldo LB a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.3-0.5, para que esté en fase de crecimiento exponencial.

- 2) Se añade en un tubo 1ml de bacteria + 2.5 ml de LB semisólido (LBss) (previamente fundido y a 45°C), se agita suavemente evitando la formación de burbujas y se vierte en una placa de LB agar.
- 3) Se espera hasta que el agar LBss esté solidificado y entonces se pone una gota de 10 µl de la suspensión fágica sobre éste. Se espera 10 min para que la gota se absorba y se incuba 18 horas a 37°C con la superficie hacia arriba.

Para saber el título fágico de la muestra (ufp/ml), es decir, el número de fagos infectivos, el protocolo a seguir es similar, con la diferencia de que en el paso 2 se añade a la mezcla de bacteria y LBss, 1 ml de diferentes diluciones decimales seriadas de la suspensión fágica que se pretende cuantificar. Se mezcla invirtiendo el tubo con suavidad y se incuba a 37°C durante 18 horas. Al día siguiente se hace un recuento del número de calvas de lisis y se realizan los cálculos pertinentes para la obtención de las unidades formadoras de calva (UFP)/ml de muestra.

*Nota: en función de la cepa bacteriana, el medio y las condiciones de cultivo variarán, pero se aplicará el mismo protocolo.

3.12 Purificación de amplímeros de PCR a partir de una banda visualizada en el gel de agarosa (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen):

Recomendado para purificar amplímeros de PCR cuando en el gel de agarosa se ha visualizado, además de la banda que se quiere amplificar, otras bandas tenues inespecíficas. Para ello se siguieron las instrucciones del fabricante que se indican a continuación:

- 1) Recortar el fragmento de gel donde se localiza la banda que queremos purificar, con ayuda de una lámpara de emisión de luz UV y usando un escalpelo estéril.
- 2) Pesar el fragmento y añadir 3 volúmenes de tampón QG por cada volumen de gel (100 mg gel ~ 100 µl).
- 3) Incubar a 55°C hasta que se disuelva el gel (10-15 min), agitar con suavidad cada 3-4 minutos.
- 4) Comprobar que el color de la solución es amarillo. Si es lila o naranja, añadir 10 µl de acetato sódico 3M pH=5.
- 5) Preparar la columna QIAquick.
- 6) Añadir la muestra en la columna y centrifugar 1 min a 11000xg. Nota: el volumen máximo de la columna son 700 µl. Si hay más muestra, ir descartando el sobrenadante, e ir centrifugando de nuevo más muestra hasta que se acabe (no usar la misma columna más de 3 veces, el filtro podría saturarse).
- 7) Descartar el sobrenadante y volver a colocar la columna en el mismo tubo.
- 8) Opcional: si el objetivo es la secuenciación de la muestra, añadir 500 µl de tampón QG y centrifugar 1 min a 11000xg, eliminando así las trazas de agarosa.

- 9) Para lavar la muestra, añadir 750 µl de tampón PE, incubar 2-5 min y centrifugar 1 min a 11000xg.
- 10) Descartar el sobrenadante y centrifugar la columna 1 min adicional para descartar el tampón residual.
- 11) Poner la columna en un nuevo Eppendorf, descartando el tubo anterior y añadir 30-50 µl de EB y centrifugar 1 min a 11000xg. El ADN se encuentra ahora en el tubo Eppendorf.

3.13 Purificación de amplímeros de PCR a partir del tubo de reacción (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen):

Recomendado para purificar amplímeros de PCR cuando en el gel de agarosa se ha visualizado una única banda de amplificación. Para ello se siguieron las instrucciones del fabricante que se indican a continuación:

Mezclar 5 volúmenes de tampón PB en 1 volumen de la mezcla de reacción de PCR conteniendo el amplímero y añadir la mezcla en la columna QIAquick. A partir de este punto, se sigue el mismo protocolo que para la purificación de bandas de geles (pasos 6-11).

3.14 Sonda marcada con digoxigenina (para hibridaciones):

Para llevar a cabo la hibridación primero se produce la sonda con digoxigenina para el gen que se quiere detectar, usando el una reacción de PCR con el PCR DIG Synthesis Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante que se detallan a continuación:

Reactivos	Volumen (µl)
Taq polimerasa	0,75
DIG Mix	5
Tampón + MgCl ₂	5
Cebador Up	1
Cebador Lp	1
H2O bd estéril	33,25
ADN	4
Volumen final	50

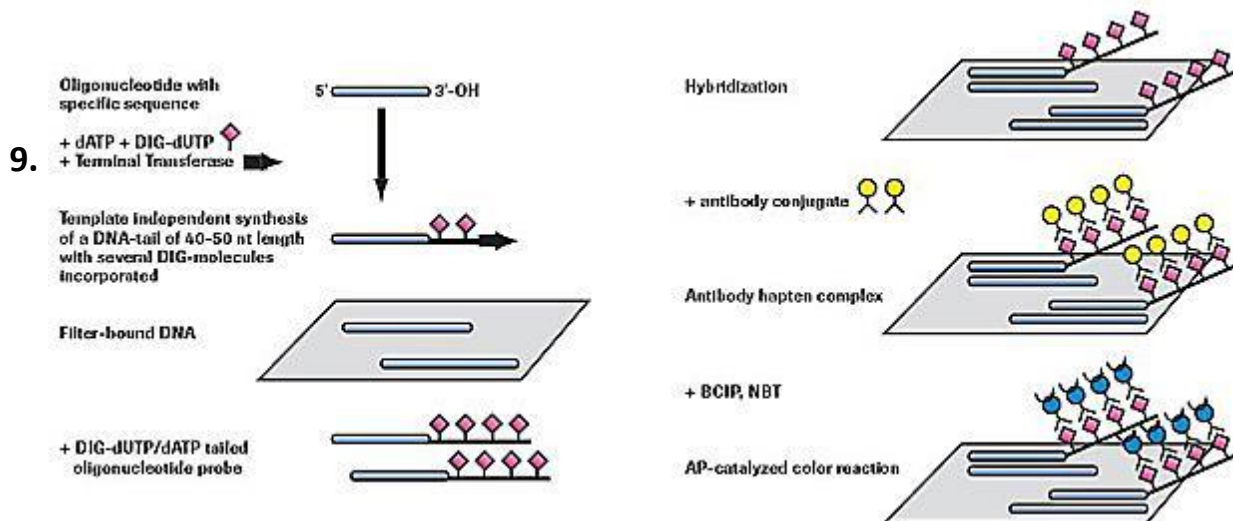
Usando el mismo programa de termociclador que se usaría para amplificar el fragmento en una PCR convencional. En este método, los dUTPs van unidos a una molécula de digoxigenina (DIG). Los

dUTPs, al ser análogos de los dTTP 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.

3.15 Hibridación colonial (“colony blot”, (Nizetic *et al.*, 1991), y protocolo descrito por Roche® para la detección de la sonda):

Con este protocolo se pretendió identificar las colonias/estrías positivas para un determinado gen, mediante el uso de una sonda específica para dicho gen. El protocolo se basó en la transferencia de las colonias/estrías a una membrana de nylon (Hybond N⁺), de alta afinidad por los ácidos nucleicos. Luego se eliminaron restos celulares bacterianos para tener el ADN celular lo más accesible posible a la sonda.

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 como se indica en el apartado X.x. El revelado se realizó con un anticuerpo específico contra la digoxigenina (antidigoxigenina), unido covalentemente a una enzima, la fosfatasa alcalina, que en presencia de una solución cromática (NBT/BCIP, Roche®) permitió el viraje de la misma a azul-lila. Por tanto, se observó coloración en aquellas zonas que habían hibridado con la sonda (reacción positiva).



1) Transferencia de colonias y lisis bacteriana.

- Las colonias bacterianas se transfirieron a una membrana de nylon con gran afinidad por los ácidos nucleicos (Hybond N⁺, Amersham®). La placa de agar con colonias/estrías se mantuvo en contacto con la membrana durante dos minutos, para favorecer una completa transferencia.
- Se colocó la membrana (siempre boca arriba) en papel Whatman® 3mm empapado con tampón de desnaturalización durante 20 min y luego se secó la durante 5 min.

- Se transfirió la membrana sobre nuevo papel Whatman® empapado con Tritón-NaOH durante 10 min, y se dejó secar de nuevo 5 min.
- Se empapó papel Whatman® con tampón de neutralización y se colocó encima la membrana 10 min. Se secó la membrana durante 5 min.
- Se lavó la membrana 5 min con 2XSSC en agitación y luego se dejó secar 5 min más.
- En este punto 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.
- Se fijó el ADN con luz UV, 2 min cada cara (empezando por la de abajo). Si no se continúa el análisis las membranas se guardan a 4°C envueltas en plástico transparente.

2) Eliminación de los restos celulares.

- La membrana se lavó con 2XSSC+1% SDS a 50°C en agitación 20 min.
- El segundo paso fue el lavado con 2XSSC+0,1% SDS, 10 min a temperatura ambiente en agitación.
- Finalmente, el último lavado fue con 2XSSC, 10 min a temperatura ambiente en agitación.

3) Pre-hibridación.

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 impidió la unión inespecífica de la sonda en zonas de la membrana libres de ADN, impidiendo la aparición de falsos positivos.

4) Hibridación.

Se eliminó el tampón de pre-hibridación y se añadió 6 ml por cada membrana del tampón de hibridación (conteniendo 10 µl de la sonda específica / 50 ml tampón de pre-hibridación). La hibridación se realizó a 64°C, en agitación durante 18 horas.

5) Lavado y revelado.

- Se realizaron dos lavados de 5 min con 2XSSC+0,1% SDS. A temperatura ambiente y en agitación.
- Después, la membrana se lavó 2 veces en 0,04XSSC+0,1% SDS a 64°C durante 15 min.
- A continuación se trató con tampón 1, en agitación durante 5 min.
- Entonces se puso en tampón 2 y se incubó 30 min, también en agitación.

- La detección de la sonda consistió en poner 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.
- Para eliminar el exceso de anticuerpo, se lavó 2 veces durante 15 minutos con tampón de lavado.
- La membrana se puso en tampón 3 (preparado al momento) durante 5 min a temperatura ambiente para equilibrarla.
- Para la reacción colorimétrica se mezclaron 2,5 ml de tampón 3 y 50 µl de NBT/BCIP (Roche®) y se añadió a cada membrana (en una bolsa de plástico sellada 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. Se mantuvo la mezcla reacción hasta que las señales, de haberlas, fueran bien visibles. Una vez visualizadas, la membrana se lavó con H₂O estéril para detener la reacción.

3. 16 Hibridación de calvas de lisis (“*plaque blot*”, Sambrook y Russell, 2001):

El proceso es similar al “colony blot”, transfiriendo los fagos presentes en las calvas de lisis a una membrana e hibridando ésta con la sonda específica para luego detectarla con una solución cromática. A diferencia del Colony blot, no se realizan algunos de los lavados intermedios necesarios para eliminar los restos celulares.

- 1) Se colocó la membrana de nylon (Hybond N⁺, Amersham®) sobre la placa durante 5 min para la transferencia de los fagos en las calvas de lisis.
- 2) Después se colocó la membrana sobre papel Whatman® de 3 mm empapado en tampón de desnaturalización durante 5 min. Se dejó secar 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.

El ADN se fijó con UV 2 min por cada cara (primero la cara inferior). Si el proceso se para aquí, guardar la membrana a 4°C.

A partir de este punto, el protocolo sigue los mismos pasos que el descrito para la hibridación colonial, a partir de la pre-hibridación.

3.17 Transducción de fagos y formación de lisógenos a partir de fagos inducidos:

Este protocolo fue desarrollado por la Dra. R. Serra-Moreno durante su tesis doctoral. Se describe a continuación:

- 1) Un cultivo o/n de la cepa lisogénica para el fago en estudio fue diluido 1:100 en caldo LB y se incubó hasta la fase exponencial ($D.O_{600}$ 0,3 - 0,5).
- 2) Se añadió el agente inductor, en este caso la mitomicina C, a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37°C durante 18h en agitación (180 rpm) y en oscuridad.
- 3) Se purificaron los fagos, para ello se centrifugó a 4°C durante 10 min a 1500xg. El sobrenadante se filtró con filtros PES (Poliéter sulfona, Millipore®) de 0,22 μm de baja adsorción proteica.
- 4) Se añadió cloroformo con una relación 1:10 (v:v) sobre la suspensión fágica.
- 5) Posteriormente se realizó un banco de diluciones decimales seriadas de la suspensión fágica en PBS o tampón para fagos.
- 6) Se mezcló 500 μl de las diluciones fágicas, 100 μl de CaCl_2 (0,1 M) y 100 μl de la cepa huésped utilizada y se incubó a 37°C 30 min en estático.
- 7) Se añadió la mezcla de cada dilución sobre una placa de LB agar que se dejó incubando 37°C durante 18h. Si el profago en estudio contenía un gen de resistencia a antibiótico, se utilizará una placa de agar conteniendo dicho antibiótico para la selección de transductantes.
- 8) Hay dos posibles resultados:
 - a) Crecimiento de monocapa celular bacteriana confluyente que puede contener o no calvas de lisis. Típico en el caso de no usar un profago conteniendo marcador de resistencia. Se deberá entonces recoger dicho crecimiento, diluirlo e inocular en placa para obtener colonias aisladas que puedan ser analizadas para la presencia de posibles lisógenos. Que no haya monocapa celular bacteriana confluyente, donde el resultado también podría ser doble:
 - b1) Aparición de colonias aisladas. En este caso se procedió a su recuento y se sembró (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. En caso de obtener colonias positivas, se confirmará que concuerdan con la cepa huésped utilizada mediante tinción gram y API 20S.
 - b2) No observar crecimiento bacteriano en placa.

3.18 Purificación de bacteriófagos por gradiente de CsCl (Sambrook and Russell, 2001):

La purificación de fagos mediante gradientes de CsCl se usó para separar y purificar las partículas fágicas de una suspensión de fagos de una muestra y eliminar otros restos presentes en la suspensión. Se siguió el protocolo descrito a continuación:

Se prepararon los stocks de los diferentes gradientes de densidad de CsCl:

Densidad (g/ml)	CsCl por muestra (g)	H ₂ O por muestra (ml)
1,3	1,124	0,875
1,5	0,908	1,09
1,7	0,624	1,375

Una vez preparados los stocks, se esterilizaron por filtración con filtros de ésteres de celulosa de alta adsorción proteica de 0,22 μ m.

- 1) Se añadió 0.5 g de CsCl por ml de la suspensión de bacteriófagos y se disolvió por agitación.
- 2) En un tubo Ultra-Clear BECKMAN® se añadieron 2 ml de sacarosa al 20%.
- 3) A continuación se realizó el gradiente de CsCl con las tres soluciones de diferente densidad añadiendo 1 ml de la de menor densidad en el fondo de la pipeta Pasteur y, a continuación, ir poco a poco con las otras dos sucesivamente. Se marcó con una señal la interfase entre los gradientes. (En el caso en el que nos salieran bandas demasiado juntas unas de otras, puede hacerse añadiendo 2 ml de cada solución. De esta forma será más fácil separarlas).
- 4) Se retiró suavemente la pipeta Pasteur y se añadió en la parte superior la suspensión de bacteriófagos (con el CsCl disuelto).
- 5) Se centrifugaron los tubos a 54000 xg a 4°C durante 2 horas (ultracentrífuga Beckman, rotor SW41 de ángulo variable), realizando un correcto equilibrado de la centrífuga. Habrá que ajustar el volumen de alguno de los tubos, usar H₂O bd estéril y tirarla muy lentamente sobre la parte superior para que se mantengan los gradientes.
- 6) Después de centrifugar, se recuperaron las bandas grises (correspondientes cada una a una fracción fágica de la muestra) que deben aparecer a densidades aproximadas de 1,45 g/ml, mediante punción del tubo con una aguja hipodérmica, dejándola gotear sobre un tubo estéril de 1,5 ml.

Una vez recuperada la suspensión fágica existe la posibilidad de realizar un segundo **gradiente Isopícnico**. 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 más CsCl. Se centrifuga a 110000xg durante 24h.

3.19 Preparación de muestras para MET (Microscopio Electrónico de Transición):

Si partimos de bandas obtenidas con un gradiente de CsCl, lo primero que habrá que hacer será dializar esas bandas para eliminar los restos de CsCl y otros posibles contaminantes que nos impedirán ver los bacteriófagos con claridad en el microscopio electrónico. Para ello se pone cada muestra en una membrana de diálisis (cerrando cada extremo con pinzas de diálisis) y se introducen en un vaso de precipitados añadiendo 1L de tampón de diálisis y dejándolo 1h en agitación. Pasada esa hora, se cambia el tampón por 1L de tampón nuevo y se dejan en agitación 18h.

Una vez tenemos las muestras dializadas en tubos de 1,5 ml, comenzamos el protocolo:

- 1) Se utilizan rejillas recubiertas con una película de Formvar (preparadas en los Servicios Científico-técnicos de la Universidad de Barcelona). Se dejan durante 5 minutos con luz ultravioleta.
- 2) Se coloca 10 μ l de la muestra sobre una parafilm en su cara limpia. Se deposita la rejilla por la cara que posee la película de Formvar sobre la muestra 1 minuto.
- 3) Se lavara pasando sobre 3 gotas de H₂O bd durante 1 minuto total.
- 4) Finalmente se deposita sobre una gota con el agente de tinción (Molibdato Amónico al 2% pH: 6,8.) durante 1- 1,5 minutos y el líquido sobrenadante se elimina con papel de filtro. Se deja secar.
- 5) Se prepara como máximo un día antes, y si puede ser, se guarda en una cámara de desecación con la humedad controlada (servicio microscopia) hasta su observación.
- 6) Se observa al microscopio electrónico (JEOL) a 100KV y entre 80000-200000 X.

8.4 ANEXO 4: CEBADORES

Gen	Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño (pb)	Ref.
stx₁	STX1A STX1B	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG ACTGCTAATAGTTCTGCGCATC	896	(Muniesa <i>et al.</i> , 2004)
Variantes stx₁	STX1up STX1Lp	TATATGTGACAGGATTTGTAA GCTTCAGCTGTCACAGTAACAAA	277	Este estudio
Variantes Stx₁	Stx1 Up Stx1 Lp	GTTGATGTCAGAGGGATAGATCCA CAAGAGCGATGTTACGGTTTGT	333	Este estudio
Variante a stx₁	Stx1aUp Stx1aLp	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG		(Scheutz <i>et al.</i> , 2012)
Variante c stx₁	Stx1cUp Stx1cLp	CCTTTCCTGGTACAACGCGGTT CAAGTGTGTACGAAATCCCCCTCTGA		Scheutz <i>et al.</i> , 2012
Variante d stx₁	Stx1dUp Stx1dLp	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA		Scheutz <i>et al.</i> , 2012
stx₂	Stx369up Stx369Lp	GCGTTTTGACCATCTTCGT ACAGGAGCAGTTTCAGACAG	369	Muniesa <i>et al.</i> , 2004
Fragmento stx₂A	S2Aup S2Alp	ATGAAGTGTATATTATTTA TTCTTCATGCTTAACTCCT	979	Muniesa <i>et al.</i> , 2003
Completo stx₂	Stx2Aup Stx2BLp Stx2BbisLp	ATGAAGTGTATATTATTTA TCAGTCATTATTAACCTG ATGCCTCAGTCATTATTAACCTG	1230	Este estudio
Rho	Rho-stx	ATATCTGCGCCGGTCTG		(Imamovic <i>et al.</i> , 2016)
pKD46 (Red recombinasa)	RR46Up RR46Lp	GAGCTCTAAGGAGGTTAT GTGCAGTACTCATTCGTT	458	(Serra- Moreno <i>et al.</i> , 2008)
pGEM	pGEM_Up	TGTAATACGACTCACTAT		Serra- Moreno <i>et al.</i> , 2008
cat	Cm-5 Cm-3	TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC CATATGAATATCCTCCTTAG	1015	(Serra- Moreno <i>et al.</i> , 2006)
tet	Tc-5 Tc-3	TCAGCCCCATACGATATAAG TGGAGTGGTGAATCCGTTAG	1200	Serra- Moreno <i>et al.</i> , 2006
kan	Kana-5 Kana-3	GTCAGCGTAATGCTCTGC GTCTGCTTACATAAACAG		Este mismo
Km-stx₂	Km-stxUp	GCGTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATT GAGCAAATAATTTATATGTGGCCGG GTCAGCGTAATGCTCTGC		Este mismo

	Km-stxLp	ACAGGAGCAGTTTCAGACAGTGCCTGA CGAAATTCTCTCTGTATCTGCCTGAAGTA TGCTTACATAAACAG		
--	----------	---	--	--

Gen	Cebador qPCR	Secuencia (5' a 3')	Tamaño (pb)	Ref.
qPCR <i>stx₁</i>	Stx1- F Stx1- R Stx1Probe	GCGGTTACATTGTCTGGTGACA GCATCCCCGTACGACTGATC FAM-TAGCTATACCACGTTACAGCG-NFQ	73	Grau-Leal <i>et al.</i> , 2015
qPCR <i>stx₂</i>	Stx2-F Stx2-R Stx2Probe	ACGGACAGCAGTTATACCACTCT CTGATTTGCATTCCGGAACGT FAM-CCAGCGCTGCGACACG-NFQ	65	Imamovic <i>et al.</i> , 2010
qPCR <i>gfpTir</i>	Gfp- F Gfp- R Gfp Probe	GCTCCATCTTCAATGTTGTGTCT CATTCTTGGACACAAATTGGAATACAAC FAM-CATGGCAGACAAACAA-NFQ	121	Quirós <i>et al.</i> , 2015
qPCR <i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{TEM}</i> F <i>bla_{TEM}</i> R <i>bla_{TEM}</i> P	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT TGCATAATTCTCTTACTGTCATG 6FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ	85	(Lachmayr <i>et al.</i> , 2009)
qPCR <i>bla_{CTX-M-1}</i>	<i>bla_{CTX-M-1}</i> F <i>bla_{CTX-M-1}</i> R <i>bla_{CTX-M-1}</i> P	ACCAACGATATCGCGGTGAT ACATCGCGACGGCTTTCT 6FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ	101	Colomer-Lluch <i>et al.</i> , 2011
qPCR <i>mecA</i>	<i>mecA</i> -F <i>mecA</i> -R <i>mecA</i> -P	CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA TGGTCTTTCTGCATTCTGGA 6FAM- AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTCC ACA-MGBNFQ	92	Volkman <i>et al.</i> , 2004
qPCR <i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F <i>qnrA</i> -R <i>qnrA</i> -P	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG 6FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ	138	Colomer-Lluch <i>et al.</i> , 2014
qPCR <i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> -F <i>qnrS</i> -R <i>qnrS</i> -P	CGACGTGCTAACTTGCCTGA GGCATTGTTGGAACTTGCA 6FAM-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ	118	Colomer-Lluch <i>et al.</i> , 2014
qPCR <i>armA</i>	<i>armA</i> -F <i>armA</i> -R <i>armA</i> -P	GAAAGAGTCGCAACATTAATGACTT GATTGAAGCCACAACCAAAATCT FAM-TCAAACATGTCTCATCTATT-MGBNFQ	93	Galimand M <i>et al.</i> , 2005

8.5 ANEXO 5: PLÁSMIDOS UTILIZADOS

