



# Estudio del fago portador de la “*Cytolethal Distending Toxin*” de tipo V en el medio ambiente

Anna Allué Guardia

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

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

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





Universitat de Barcelona

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

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología. Universidad de Barcelona

# **Estudio del fago portador de la “*Cytolethal Distending Toxin*” de tipo V en el medio ambiente**

Memoria presentada por

**Anna Allué Guardia**

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

La directora

La doctoranda

Dra. Maria Teresa Muniesa Pérez

Anna Allué Guardia

Barcelona, Febrero de 2014





*“Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento.”*

Louis Pasteur (1822-1895), químico y microbiólogo francés.



## Agradecimientos

Por fin!!! Después de mucho estrés, sudor y lágrimas: aquí está la TESIS!! Ha sido un duro camino, pero por fin todo el esfuerzo ha dado sus frutos. Y puedo decir que ha valido la pena. Ha sido una experiencia increíble y, a pesar de todo el trabajo, también ha habido grandes momentos para recordar. Es un camino que recorrería una y otra vez sin pensármelo dos veces. No sólo por todo el proceso de aprendizaje académico y la adquisición de experiencia en el trabajo, sino por la calidad humana que me he encontrado al trabajar aquí. He conocido a grandísimas personas y está claro que me llevo grandes amigos. No sé como expresar todo lo que esta experiencia ha supuesto para mí. Sólo decir que gracias, muchas gracias a todos por hacer que esto haya sido posible.

En fin, dejemos a un lado la parte trascendental y vayamos a lo más importante: los agradecimientos.

Para empezar, quiero dar las gracias a los "jefes": a Anicet, Francisco (no te preocupes, que a partir de ahora que ya no tengo que escribir una tesis me pasaré todos los veranos en la playa y me pondré negra!!), Joan (con todo su conocimiento y sabiduría) y Maite. Especialmente a Maite, por darme la oportunidad (allá por otoño del 2009) de poder formar parte del "Lab 10: *phage team*". Gràcies per ser una persona tan propera, i per ajudar-me en tots els meus conflictes i aconsellar-me a l'hora de prendre decisions. Mai has tingut males paraules, ens has tractat a tots amb respecte i ens has donat molta llibertat. Gràcies també perquè et vas portar genial quan jo no estava bé. Perquè has sigut una jefa de confiança i molt "enrotllada"!

Bueno, y qué decir del lab 10! Chicos, hemos compartido de todo: penas y alegrías, esperanzas y decepciones... Nos hemos reído y nos lo hemos pasado muy, muy bien! Pasar el día a día con vosotros ha sido genial. Gracias a vosotros madrugar no ha sido tan duro, porque en el lab todo eran buenas caras y risas, y el buen rollo ha hecho que los momentos "choff" desaparecieran. Ir a trabajar cada día con vosotros ha sido un placer. Gracias también por aguantarme en mis momentos malhumorados, y sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba. No sólo sois compañeros de trabajo, sois AMIGOS con quien compartir sueños, ilusiones y planes futuros. Para lo bueno y para lo malo. De verdad, muchísimas gracias por hacer que estos cuatro años hayan sido una experiencia maravillosa. Sin vosotros no lo hubiera podido conseguir, así que esta tesis no sólo me la dedico a mí, sino también a todos vosotros. Porque cuando uno está a gusto se refleja en su trabajo. También os estoy infinitamente agradecida de que

cuidárais de mí cuando estuve enferma, porque sé que os pasásteis muchos fines en el lab trabajando por mí, y eso no tiene precio. Porque ese es el significado de amistad, estar también allí en los momentos duros, y conseguir superarlos. Chicos, os escharé mucho de menos en el día a día, aunque sé que esto no termina aquí y que seguiremos viéndonos, yendo de “calçotadas”, cenas y fiesta.

A los cuatro mosqueteros: Marta G, Marta C, Alex y yo. Las Martas y yo, que estamos juntas desde el principio, y un año después llegó Alex. Hemos compartido de todo: los momentos de estrés de “esto tiene que estar acabado antes de las vacaciones”, el papeleo de las becas y las matrículas, los congresos, las bromas... Y mira, después de todo, aquí estamos: a punto de acabar y de empezar una nueva etapa.

A la Marta G, la meva compi de “frikadas”, crec que no hi ha ningú que m’entengui millor que tu. Amb qui compartiré ara cotilleos fent el café de les 8 al bar de geo??? Per què el dia sempre comença molt millor després d’aquest moment de relax a primera hora del matí. Perquè parlar amb tu i compartir els problemes i les penes em reconforta, perquè m’ajudes a veure les coses de forma més positiva i optimista i amb més confiança. I ara qui establirà la “dictadura musical Disney i de bandes sonores de pelis”?? I qui cantarà les cançons i, a força de posar-les, farà que a tothom se li enganxin? Junt amb la Rachel i l’Andreu som el “Phenomena Experience team”, a veure si continuem mantenint la tradició que vam començar fa gairebé 3 anys. I res, donar-te les gràcies perquè sempre has estat allí i m’has escoltat, en els moments bons i dolents, i perquè sé que puc comptar amb tu.

A la Marta C, la “Hulk” del laboratori. Perquè fa que les coses semblin més fàcils i que els problemes no semblin tan greus, perquè ella sempre pot amb tot i això em dona confiança per seguir endavant. I perquè és molt graciosa en “modo estrés”. Perquè és una “currante” nata i segueix al peu de la lletra allò de “no deixis per demà el què pots fer avui”. I això fa que em posi les piles. Gracias también a Alex, sabes que no digo en serio lo de “maldito Alexandre”. O sí? Jejejeje. Porque ya no dejo que me tomes el pelo, ya te tengo calado, y porque haces que cada día sea una aventura con tus historias, tus bromas y tus comentarios. Porque aunque siempre estás de broma, eres currante como el que más. Y porque siempre te ofreces para ayudar en lo que sea a los demás (creo que te debo ya millones de cafés!!), y consigues solucionar los problemas en los momentos de estrés. Qué haríamos sin tí??

Y qué decir de Aiora? Simplemente eres una persona genial! (bueno, excepto cuando haces “la mirada de lado”, que entonces das mucho miedo! Jejejeje). Porque eres

la “fuente de sabiduría suprema” y siempre tienes la solución para todo, y porque eres a la que acudo cuando tengo cualquier tipo de problema (ya sabes, en especial cuando me peleo con el ordenador). He de reconocer que siempre me ha ido muy bien siguiendo los consejos que me has dado. Eres como la hermana mayor que nunca he tenido, siempre cuidando de mí y asegurándote de que tome las decisiones correctas. Además, tendrás mi eterna admiración por ser la “reina del Ilustrum”! A ver si algún día consigo llegar a ese nivel! Si es que entre las tres que formamos el “Ilustrum team” original hemos conseguido llevar a “casi” todos los del lab al lado oscuro... Muchas gracias por todo.

Bueno y también a las últimas incorporaciones (aish lo que os espera!): Pablo, nuestro “sexyman” del norte, que las trae a todas locas. Que sepas que aún nos debes la fabada y, cuando se trata de comida, no lo perdonamos! William, o más bien “sir William”, siempre tan correcto y educado, aunque creo que nos acordaremos durante mucho tiempo de tu chapuzón en el río. Y a nuestros “chiquis” actuales del máster: Carmen, la “heavy metal” y chica “Disney” (rara combinación pero cierta), y Ferran, el más gamberro y follonero.

También vull donar les gràcies a l’Elisenda, amb el seu bon humor i l’encantador accent d’Arbeca. Sempre tan maca ella. Perquè les baralles de matrimoni amb l’Alex són molt divertides i ens amenitzen el dia. También a los que nos dejaron hace poco: a Ana Melgarejo (o debería decir “Ana María”, ehh Laura?? Jajaja), porque me recuerda a mí cuando empecé, tan inocente y con tendencia a estresarse fácilmente... Y a Miriam P (de Pascual o de “Petita”), nuestra “Khalessi”, tan dulce y tímida pero a la vez con las cosas tan claras y la cabeza tan bien puesta en su sitio.

Y tampoco me puedo olvidar de agradecerles a los que se fueron hace ya más tiempo. A Lejla, una persona de apariencia dura, pero con un enorme corazón. Echamos de menos tus frases célebres y tus palabras inventadas, “teóricamente” y toda una larga lista... Tú eras capaz de superar cualquier obstáculo, haciendo que todo pareciera un juego de niños. Y a las chicas, que estuvieron conmigo cuando llegué, siempre con sonrisas y buen humor, haciendo que las cosas fueran mucho más fáciles al principio: a Ruth, una de las veteranas, que me acogió y me enseñó con paciencia cuando llegué, a pesar de estar liada terminando la tesis, a Carol, siempre con una sonrisa amable y con su acento encantador, y a Fanny, mi compi de la “canción del Cacaolat”, gracias por tener tanta paciencia conmigo, sé que no fui fácil.

Y no menos importantes son los compis del laboratorio 9. Quiero agradecer a Rachel, siempre tan dulce y cariñosa, capaz de subirle la moral a cualquiera. Porque me

identifico mucho contigo, porque nos encantan las pelis retro, el “Hard rock” y el japonés. Eres la persona que siempre está dispuesta a ayudar a todos, por mucho trabajo que tengas. Además de la enorme paciencia que tienes, creo que eres la chica más trabajadora que conozco. Gracias también por descubrirnos el mundo “Phenomena”!. A Julia, siempre tan centrada y tan dispuesta, recuerda que tienes que seguir con la tradición del café a las 8 cuando Marta y yo ya no estemos. A la Míriam, una persona “digna de admirar”, que sempre em resol els dubtes i que ens fa riure amb les seves històries inverosímils. A la Laura, que sempre sorprèn amb els seus comentaris i que mai saps per on et pot sortir, perquè és la “dues cares”: sembla molt bona i innocent però en el fons és una gamberra! Jajaja. I a la Cris, la nostra “mami” preferida.

También agradecer a los que ya no están aquí: a Marussss, ay “marica” cómo te echamos de menos! Tan cariñosa y marchosa, capaz de contagiar a todos con tu buen humor y tu “ritmo latino”. A l’Arnau, que va aportar una nova paraula a l’argot del laboratori: el “sisu-sisu”, una paraula molt característica de nosaltres però que poc a poc comença a traspasar fronteres. Tot i que ningú ha sigut capaç encara de fer el sorollet com tu. Al Jordi, què dir de tu? Doncs que he guanyat un amic per sempre, tan autèntic i capquadrat, no canviïs mai, sigues tu mateix, pensin el que pensin els altres. Has sigut una espatlla on plorar en els moments de “bajón”, sempre disposat a escoltar els meus problemes i dubtes, sempre allí, passés el que passés. I també ens ho hem passat molt bé. Anyoro aquella època, amb l’Andreu, la Marta, tu i jo. També agrair a la Sílvia M, sempre tan implicada amb la feina i tan perfeccionista, al Sergi, que ara per fi s’està dedicant a allò que li agrada, a Raquel 2, que siempre endulzaba las mañanas con sus pastelitos, y a Ana Costán, siempre tan amable y tan dulce, y que me ayudó tanto los veranos que trabajé en el lab 9.

No me puedo dejar tampoco a todos los que han formado parte del laboratorio 8: Chus, con su buen rollo y su buen humor capaz de contargiarlo a todos, Ayalke con su “qué tal chiquita?”, y Byron, tan amable y atento. A Xavi (conocido como “Persi”), tan genial que con sus locuras hace que cada día sea una fiesta. A Sílvia Cervero, una superviviente, siempre tan decidida i con una gran autodeterminación, y a Sarah, que me ayudó mucho con el tema de los *Campylobacter*. Gracias también a Marta Rusiñol, compi de máster, Laura, Sandra, Tarik, Sílvia Bofill, “Persia” y Carmina.

Y tampoco me olvido de Markus, el alemán del departamento, siempre con sus dietas y sus “mejunges” raros de proteínas, las chicas del laboratorio 7 y todos los de fase I. Gracias también a los chicos de secretaría: Rosario, tan alegre como siempre, qué haríamos para solucionar todos los “problemas técnicos” del departamento sin ella, Bea,

Susana, Macu y Manolo. Por hacer que todo el lío y el papeleo sea un poco más fácil. Finalmente, me gustaría agradecer también a todos los miembros del departamento que os portáis tan bien cuando estuve enferma, por preocuparse y preguntar por mí, porque saber que la gente piensa en ti en los momentos difíciles ayuda a superarlo, y eso significa mucho para mí. Gracias también al equipo del bar de Geología, porque a las 8 de la mañana agradezco tanto su buen humor y su amabilidad! Porque sin el café de primera hora los días no serían lo mismo.

Quiero agradecer también a mi familia y a mis amigos, porque también han vivido en directo los altos y los bajos de estos cuatro años de doctorado, los momentos de estrés y los de alegría. Porque son los que me han tenido que aguantar cuando volvía a casa disgustada o enfadada, y me han ayudado a superar los malos momentos gracias a sus consejos. También he disfrutado con ellos los pequeños triunfos y avances. Porque he podido desahogarme y compartir con ellos todas las experiencias de estos años, y han vivido en directo y día a día todos los pormenores de esta experiencia. Gracias a mis padres Juan y Mercedes, a mis hermanas Míriam e Inés, a mi tía Mercè y a mi "lala" Ignacia, a mi tío Jose, a la Montse, l'Andreu i l'Esteve, y a todos mis amigos, que me han ayudado a superar esta recta final.

I per últim vull agrair-li tot a la persona més important: al meu "carinyu", al meu amor, a la persona més important de la meua vida. Ens vam conèixer al departament al 2010, i des de llavors som inseparables. Gràcies per ser el meu amic, el meu confessor, la meua consciència, per ser el meu "tot". Perquè has estat testimoni de totes les meves vivències i les meves crisis, perquè m'has aguantat tant en els moments bons com en els dolents, perquè has sigut l'espatlla on plorar i perquè m'has recolzat sempre. Tu ets el meu pilar i fas que sigui millor persona. Perquè sempre m'animes, em cuides i procures el millor per mi, perquè anteposes les meves necessitats a les teves i em complementes. No sé què faria sense tu! Moltes gràcies per tot, t'estimo.

Ha sigut un camí llarg i dur que m'ha aportat molt, tant d'aprenentatge intel·lectual com personal, i m'ho he passat molt bé. Simplement, **MOLTES GRÀCIES** a tots.





## Índice de contenidos

Agradecimientos .....	7
Índice de contenidos .....	13
Abreviaciones .....	15
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	17
1.1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	19
1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	20
1.3. <i>Escherichia coli</i> patogénicas .....	20
1.4. <i>Escherichia coli</i> productoras de toxina Shiga o STEC .....	26
1.5. Transmisión.....	29
1.6. Factores de virulencia de STEC .....	30
1.6.1. La toxina Shiga o Stx.....	31
1.6.2. Otros factores de patogenicidad .....	33
1.7. Elementos genéticos móviles en STEC.....	36
1.8. Bacteriófagos portadores de genes de virulencia .....	41
1.9. Infección y replicación de los fagos .....	44
1.9.1. Ciclo lítico vs. ciclo lisogénico en los fagos atemperados .....	46
1.9.2. Efectos de la integración de fagos atemperados sobre la cepa huésped.....	47
1.9.3. La inducción fágica: de ciclo lisogénico a ciclo lítico .....	48
1.10. La “ <i>Cytolethal Distending Toxin</i> ” y los fagos Cdt .....	50
1.11. Persistencia de los bacteriófagos portadores de genes de virulencia frente a diferentes condiciones ambientales y tratamientos de inactivación .....	53
2. OBJETIVOS .....	59
3. RESULTADOS .....	63
3.1. El bacteriófago Cdt-V inducido a partir de cepas de <i>Escherichia coli</i> no clínicas ..	65
3.2. Estabilidad e infectividad de bacteriófagos Cdt-V en un mesocosmos acuático y bajo diferentes condiciones de inactivación .....	85
3.3. Persistencia de bacteriófagos Stx infectivos tras diferentes tratamientos de desinfección .....	99
3.4. Evolución de un fago Cdt-V auto-inducible, desde <i>Escherichia coli</i> O157:H7 hasta <i>Shigella sonnei</i> .....	115
4. DISCUSIÓN GENERAL .....	133
5. CONCLUSIONES .....	151
6. BIBLIOGRAFÍA .....	155
7. ANEXOS .....	175
Anexo 1. Protocolos .....	177

Anexo 2. Composición medios de cultivo y tampones.....	197
Anexo 3. Cebadores usados en este estudio.....	203
Anexo 4. Programas de PCR.....	206
Anexo 5. Plásmidos usados en el estudio.....	211
Anexo 6. Secuencia completa del fago $\Phi$ AA91-ss.....	212

## Abreviaciones

A/E	Adhesión e invasión (“ <i>Attaching and effacing</i> ”)
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
<i>cat</i>	Gen de resistencia a cloramfenicol
CDT	“ <i>Cytolethal Distending Toxin</i> ”
CG	Copias Genómicas
Da	Dalton
DIG	Digoxigenina
dNTP	Deoxiribonucleótido
DO	Densidad Óptica
ds	Doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
IS	Secuencia de inserción
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
lp	“ <i>Lower primer</i> ”
°C	grados Celsius
ORF	“ <i>Open Reading Frame</i> ”
<i>p</i>	Variable de significación estadística
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (“ <i>Polimerase Chain Reaction</i> ”)
rpm	Revoluciones por minuto
ss	Cadena simple de ADN
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de la Toxina Shiga
Stx1	Toxina Shiga 1
Stx2	Toxina Shiga 2
T	Temperatura
T <sub>m</sub>	Temperatura de “ <i>melting</i> ”
ufc	Unidades formadoras de colonias
ufp	Unidades formadoras de calvas
up	“ <i>Upper primer</i> ”
UV	Luz ultravioleta



# **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**



### **1.1. Familia *Enterobacteriaceae***

Las Enterobacterias son una familia de bacterias Gram negativas que comprende más de 40 géneros y 100 especies (Brenner y Falkow, 1971). Pueden tener morfología de bacilos, cocos o ser pleomórficas y son fáciles de cultivar, sin grandes exigencias nutricionales. Son anaeróbicas facultativas, ya que son capaces de fermentar carbohidratos (especialmente glucosa y lactosa) en condiciones anaeróbicas y oxidar una amplia gama de sustratos en condiciones aeróbicas. También pueden reducir el nitrato a nitrito. Son quimioheterótrofas, necesitando para su crecimiento carbono y nitrógeno, aunque en algunos casos también vitaminas y aminoácidos. No forman esporas y muchos géneros tienen uno o más flagelos que utilizan para desplazarse. Son catalasa positivas pero oxidasa negativas, puesto que carecen de la enzima citocromo oxidasa (excepto el género *Plesiomonas*).

Entre los principales géneros se encuentran: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Proteus* o *Yersinia* (Brenner *et al.*, 2005). Los serotipos dentro de una misma especie se clasifican en función de los antígenos celulares: el antígeno O del lipopolisacárido (LPS), el antígeno H o flagelar y el antígeno K o capsular (Stenutz *et al.*, 2006). Algunos aislamientos se clasifican como ONT, clasificación provisional para cepas con grupos de antígeno O no estandarizados (Gyles, 2007).

Las enterobacterias son, en general, microorganismos que suelen hallarse en el tracto digestivo de los vertebrados, ya sea de forma natural, o bien durante un proceso de infección. De aquí su nombre, que procede del griego “*entéron*”, que significa intestino. Allí contribuyen a la degradación del alimento y la producción de gas debido a la fermentación. También pueden encontrarse formando parte de la flora de la cavidad bucal, las fosas nasales o el tracto genital femenino. Su temperatura óptima de crecimiento es entre 22°C y 37°C. No obstante, algunas especies también pueden hallarse en el suelo, en plantas, o en animales acuáticos. Además de bacterias pertenecientes a la flora habitual del intestino, la familia *Enterobacteriaceae* incluye diversos patógenos que causan infecciones intestinales para el ser humano (Center for Disease and Control: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

## 1.2. Escherichia coli

*Escherichia coli* es un cocobacilo gram negativo perteneciente a la familia de las Enterobacterias. Es una bacteria anaeróbica facultativa, puesto que es capaz de metabolizar la glucosa y la lactosa mediante fermentación ácido-mixta, y puede oxidar una gran variedad de sustratos en condiciones aeróbicas. También se caracteriza por otras propiedades metabólicas como la capacidad de reducción de nitratos para obtener nitritos o la ausencia de citocromo C en su cadena respiratoria (Brenner *et al.*, 2005). Además, es quimioheterótrofa, catalasa positivo y no forma esporas.

*E. coli* se ha asociado siempre a la flora bacteriana comensal de la mayoría de animales de sangre caliente, representando cerca del 80% de la flora aeróbica intestinal, aunque también encontramos una presencia significativa de los géneros *Klebsiella* y *Proteus*. *E. coli* se encuentra colonizando la mucosa del colon de forma natural (desde el ciego hasta el recto), donde desarrolla funciones fisiológicas beneficiosas para su huésped, como el procesamiento de residuos alimentarios o la síntesis de factores nutricionales esenciales. Los individuos sanos suelen excretar diariamente una concentración de  $10^8$ - $10^9$  unidades formadoras de colonias de *E. coli* por gramo de heces (ufc/g de heces), corroborando así su papel como una de las principales bacterias anaeróbicas facultativas intestinales.

*E. coli* se ha convertido también en un organismo modelo para estudiar la evolución del genoma bacteriano debido a la gran diversidad que existe en esta especie, ya que representa un buen ejemplo de los diferentes procesos y cambios genéticos que pueden ir sucediéndose en la evolución de un genoma. Además, la rápida tasa de crecimiento y el hecho de tener necesidades nutricionales simples permiten el fácil cultivo y manipulación en el laboratorio. Por estas razones, en los últimos años se ha convertido en una de las formas de vida procariota más estudiadas.

## 1.3. Escherichia coli patogénicas

*E. coli* es una bacteria generalmente no patógena que coloniza el intestino de humanos y animales, contribuyendo a la regulación metabólica y al control del equilibrio entre las diferentes especies bacterianas presentes. Pero en ocasiones puede ser un importante patógeno (Nataro y Kaper, 1998), ya sea una cepa comensal o exógena, y causar severas patologías intestinales y extraintestinales (meningitis, septicemia, neumonía, diarreas, infecciones urinarias etc.), mediante la expresión de diferentes



factores de virulencia que afectan a un amplio espectro de procesos celulares. De esta manera, *E. coli* representa una importante causa de mortalidad en todo el mundo, especialmente en países subdesarrollados, afectando principalmente a niños y lactantes (Bern, 2004).

Se han descrito diferentes grupos de *E. coli* patógenas, que se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. Infecciones generadas por *E. coli* endógenas o IPEC (de la propia flora intestinal), que actúan como oportunistas en casos de septicemia, sobreinfecciones, inmunodepresión, malnutrición, uso de antibióticos, etc (Wain *et al.*, 2001):

a) *E. coli* uropatógenas o **UPEC**: causan infección en el tracto urinario.

b) *E. coli* causantes de sepsis y meningitis neonatal o **NMEC**.

2. Infecciones causadas por *E. coli* exógenas (ExPEC) que por ingestión entran al organismo, entre las que distinguimos 6 subgrupos:

a) **EPEC**: Las *E. coli* enteropatógenas producen enteritis de diversos grados, consecuencia de las lesiones A/E (“*attaching and effacing*”) que se caracterizan por la degeneración de las microvellosidades del intestino. La bacteria, tras la unión inicial al enterocito, activa determinadas vías de señalización que provocan una acumulación de actina en la región apical de la célula intestinal formando una estructura de pedestal, que permite la unión íntima de la bacteria al enterocito. Esto provoca una respuesta inflamatoria y cambios en la permeabilidad de la célula intestinal, causando la secreción de electrolitos y la reorganización del citoesqueleto, cambios fisiológicos responsables de la diarrea acuosa (Celli *et al.*, 2000) característica de esta infección.

Las EPEC suelen causar diarrea infantil, afectando a niños menores de dos años, siendo una de las principales causas de mortalidad por enteritis en niños de países en vías de desarrollo (Nataro *et al.*, 1998). Forman parte de este grupo algunas cepas de los serotipos O55 y O26 (Levine *et al.*, 1987; Margall *et al.*, 1997).

b) **EIEC**: La *E. coli* enteroinvasiva causa diarrea acuosa, con mucosidad y sanguinolenta, o colitis inflamatoria, y afecta tanto a niños como a adultos, siendo endémica de países en desarrollo. Se trata de un patógeno intracelular obligado.

Se caracteriza por un mecanismo invasor idéntico al de *Shigella spp*: se produce la entrada de la bacteria a la célula epitelial por endocitosis tras la adhesión, y la multiplicación bacteriana en el citoplasma del enterocito, invadiendo posteriormente las células adyacentes y causando una forma de disentería bacilar (Fig.1). Pero, a diferencia de *Shigella*, EIEC no produce la toxina Shiga (Stx). Tanto EIEC como *Shigella* son lactosa y descarboxilasa negativas, no móviles.

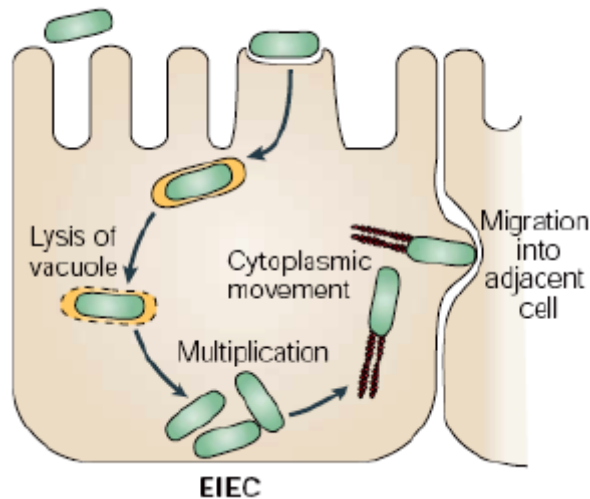


Figura 1. Mecanismo de acción de EIEC (<http://microbiologia2012-13.blogspot.com.es/2013/03/tropismo-de-las-bacterias-para-un.html>).

Algunas cepas de los serotipos O29, O124 y O136 (Levine *et al.*, 1987; Margall *et al.*, 1997) se encuentran dentro de este grupo.

- c) **ETEC**: Son las *E. coli* enterotoxigénicas. Producen enteritis y diarrea, sobretodo en niños (siendo los lactantes un grupo de riesgo), mediante un mecanismo de producción y liberación de toxinas. Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado (Fig.3) mediante fimbrias o pilis, y luego sintetizan y liberan dos tipos de toxinas: la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST). Éstas aumentan el nivel intracelular de AMPc y GMPc, provocando la salida de agua e iones de la célula (Fig.2), causando diarrea acuosa (Sears *et al.*, 1996). Los genes de estas toxinas se localizan generalmente en un plásmido.

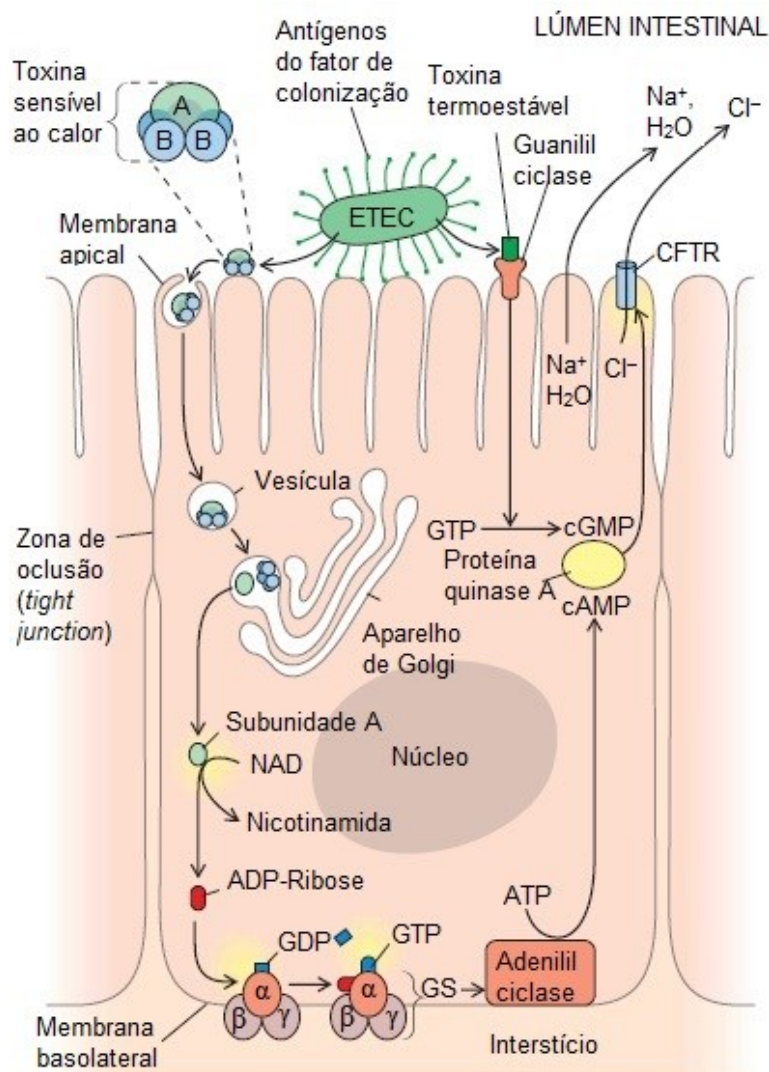


Figura 2. Mecanismo de acción de ETEC  
(<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine>).

Pertencen a este grupo algunas cepas de los serotipos O6, O8 y O15 (Levine *et al.*, 1987; Margall *et al.*, 1997).

- d) **EAEC**: Las *E. coli* enteroagregativas son la principal causa de diarrea mucosa infantil persistente producida por *E. coli*, y una de las causas más comunes de la llamada diarrea del viajero. Se caracterizan por la autoaglutinación o formación de agregados de las bacterias en la superficie del enterocito, que permiten una mejor colonización, y los serotipos predominantes son O3:H2 y O44:H8, entre otros.

La adhesión al enterocito tiene lugar por su polo apical y se lleva a cabo mediante determinadas fimbrias o adhesinas flexibles bacterianas. Han sido descritas, por

ejemplo, la AFF/I (Nataro *et al.*, 1992) o la AFF/II (Czeczulin *et al.*, 1997), aunque no todas las EAgEC presentan estas fimbrias. También se sabe que estas cepas son capaces de estimular en la mucosa intestinal la producción y secreción de moco, que permite la aglutinación de las bacterias en el epitelio, cosa que explicaría la gran capacidad de este grupo para colonizar de forma persistente el intestino. Los genes que participan en la agregación se encuentran localizados en la familia de plásmidos pAA (Harrington *et al.*, 2006; Croxen y Finlay, 2010). EAgEC es también productora de toxinas (Levine *et al.*, 1987; Knutton *et al.*, 1992), que también contribuyen a su patogenicidad.

- e) **EHEC**: Las *E. coli* enterohemorrágicas (Levine *et al.*, 1987) suelen causar diarreas o colitis hemorrágicas (CH), que pueden dar complicaciones graves como el síndrome urémico hemolítico (SUH) o la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT). El serotipo mejor estudiado es el O157:H7.

El principal mecanismo de patogenicidad causante de las complicaciones graves de las EHEC es la toxina Shiga o Stx, codificada en un bacteriófago. Otros factores de virulencia de este grupo son la intimina (codificada por el gen *eae*, que participa en el fenómeno A/E) y el plásmido pO157, que codifica para la enterohemolisina (Schmidt *et al.*, 1995).

Actualmente, hay al menos dos criterios de clasificación de las EHEC. El primero, en función de la presencia o ausencia de los diferentes factores de patogenicidad. El segundo es en función del serotipo, dónde se distinguen dos grupos: el de las cepas O157:H7, uno de los serotipos más estudiados y virulentos cuyo reservorio principal es el tracto intestinal del ganado bovino (World Health Organization, 1998), y el de las cepas no-O157:H7, que a diferencia de las anteriores, pueden fermentar el sorbitol, y comprenden el resto de serotipos existentes (más de 200 descritos).

- f) Finalmente existiría una sexta categoría, la formada por las **DAEC** o *E. coli* de adhesión difusa (Nataro y Kaper, 1998). Se han aislado cepas de este grupo tanto en personas sanas como en personas con diarrea acuosa, sin sangre ni leucocitos, siendo mayoritario en niños de entre 4-5 años.

Se sabe poco sobre su mecanismo de acción, aunque se consiguió identificar una fimbria de superficie, llamada F1845, involucrada en la adhesión (Bilge *et al.*,

1989) y codificada en el cromosoma o en un plásmido. Parece que estas cepas tienen la capacidad de inducir estructuras protuberantes, que protegen a las bacterias, pero no forman agregados y de ahí su característica de adhesión difusa. Los serotipos predominantes de este grupo son O15, O75 y O126.

Otras clasificaciones de *E. coli* se basan en las propiedades filogenéticas o en el origen de aislamiento. También en función del huésped donde se localizan o simplemente por poseer un factor específico de virulencia (como *E. coli* productoras de Stx).

De esta manera, se propuso la creación de un nuevo orden en la clasificación que comprendería las cepas de *E. coli* productoras de verotoxina (Vtx) o toxina Shiga (Stx) (**VTEC** o **STEC**) (O'Brien y Kaper, 1998), un importante patógeno emergente, causante de numerosos brotes a nivel mundial. Formarían parte de este grupo principalmente los serotipos O157:H7 (EHEC) y cepas pertenecientes a O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H8, O18, O128 y O138 que también producen Stx (Acheson *et al.*, 1998; Allison, 2007; Mora *et al.*, 2007). También se han incluido cepas productoras de Stx de serotipos pertenecientes a las EPEC y recientemente el serotipo O104:H4 causante del brote en Alemania en mayo del 2011 (Muniesa *et al.*, 2012).

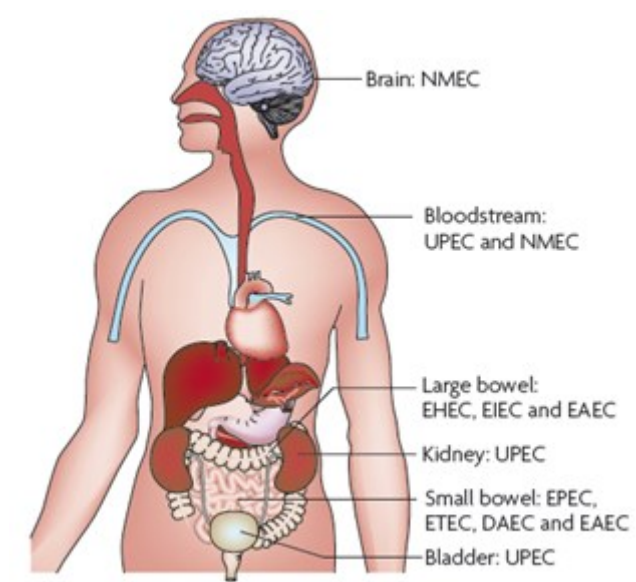


Figura 3. Órganos y zonas afectadas por los diferentes grupos de *E. coli* patogénicas (Croxen y Finlay, 2010).

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

La Stx fue descrita por primera vez en 1898 por Kiyoshi Shiga en un paciente con diarrea infectado con *Bacillus dysenteriae* (Trofa *et al.*, 1999). Más tarde, en 1977, Konowalchuk y colaboradores observaron que algunos aislamientos de *E. coli* producían una toxina con efecto citopático en la línea celular Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977). De aquí apareció el término “*E. coli* Verotoxigénica o productora de toxina Vero” o VTEC. A principios de los años '80, se aisló esta toxina y se vio que poseía muchas de las características y propiedades de la Stx producida por *Shigella dysenteriae* de tipo I (O'Brien *et al.*, 1982), descubierta por Kiyoshi Shiga. Entonces apareció el término “*E. coli* productora de Stx” o STEC y desde entonces VTEC y STEC han sido utilizados de forma indistinta para designar a cepas que contienen los genes *stx* (Kaper *et al.*, 2004).

Además de en cepas de *E. coli* y de *Shigella dysenteriae* de tipo I, se han encontrado secuencias iguales o similares de *stx* en algunas cepas de *Shigella* (O'Brien *et al.*, 1977; Bartlett *et al.*, 1986), *Aeromonas* spp. (Haque *et al.*, 1996), en *Enterobacter cloacae* (Paton y Paton, 1996), o *Citrobacter freundii* (Schmidt *et al.*, 1993), así como también en *Campylobacter* spp. (Moore *et al.*, 1988).

Actualmente se han descrito más de 400 serotipos de *E. coli* con los genes *stx*, siendo los serotipos de EHEC, especialmente las cepas O157:H7 (cuya dosis infecciosa se estima en menos de 100 microorganismos) (Tilden *et al.*, 1996; Paton y Paton, 1998), los más patogénicos. Además de la Stx, las STEC pueden contener otros factores de virulencia que, junto con la falta de un tratamiento efectivo, facilitan la aparición de complicaciones potencialmente mortales como es el síndrome urémico hemolítico.

De esta manera, STEC puede causar un amplio espectro de enfermedades en humanos, aunque hasta el momento menos de 10 serotipos son los principales responsables de la mayoría de estas enfermedades. Los síntomas van desde dolores abdominales y diarrea, que puede progresar a colitis hemorrágica (CH) (Riley *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 1984), hasta complicaciones más severas y potencialmente mortales, especialmente en niños y ancianos, como el síndrome urémico hemolítico (SUH) (Paton y Paton, 1998; Caprioli *et al.*, 2005) o su variante llamada púrpura trombótica trombocitopénica (PTT).

Los síntomas de SUH son: insuficiencia renal aguda y destrucción de los glomérulos, anemia hemolítica y trombocitopenia. Está causada por la actividad de la Stx, y se desarrolla en un 15% de los pacientes menores de 10 años. La variante PTT se

diferencia de la anterior en la aparición de complicaciones neurológicas y fiebre (Paton y Paton, 1998).

El serotipo de *E. coli* O157:H7 es el principal causante de infecciones en humanos, aunque otros serotipos, como O26:H11/H-, O103:H2, O111: H-, y O145:H28/H- se han asociado con epidemias de EHEC. De esta manera, los serogrupos O157:H7, O26, O103, O145 y O111 son conocidos como los “*Top five*” (Beutin 2006) o las cinco cepas patógenas más virulentas de STEC asociadas a brotes alimentarios a nivel mundial, según la EFSA (“*European Food Safety Association*”). Este último año ha aparecido el término “*Top Six*”, al incorporarse la cepa O104:H4 causante del brote originado en Alemania como nuevo patógeno emergente en este grupo. En los EEUU, los serotipos O26, O45, O103, O111, O121, O145 y recientemente el O104 se consideran los más patógenos entre los no-O157, además del O157:H7 (<http://www.fsis.usda.gov>).

El 8 de Mayo de 2011 se inició el mayor brote alimentario de STEC jamás descrito en Alemania, que también se extendió a Francia (King *et al.*, 2012) y que se declaró finalizado el 4 de Julio con un total de 3842 casos, con 855 casos de SUH y más de 50 muertes. Parece ser que la epidemia fue causada por el consumo de brotes de soja de fenogreco contaminados (Laing *et al.*, 2012), aunque también se detectó transmisión fecal-oral. El organismo causante fue una nueva cepa de O104:H4 muy virulenta, perteneciente al grupo de las EAEC, que tenía una combinación inusual de genes de virulencia de STEC (*stx*<sub>2</sub>, LPF o fimbria larga polar, resistencia a telurito y sistema de secuestro de hierro) y EAEC (AAF/I, el regulador transcripcional AggR, la dispersina Aap, la proteína Pic y la enterotoxina Set1 de *Shigella*) (Bielaszewska *et al.*, 2011) (Fig.4), estos últimos codificados mayoritariamente en el plásmido pAA. De esta manera, apareció una combinación inusual de dos elementos genéticos móviles, un plásmido y un fago Stx, contribuyendo a la patogenicidad de la cepa.

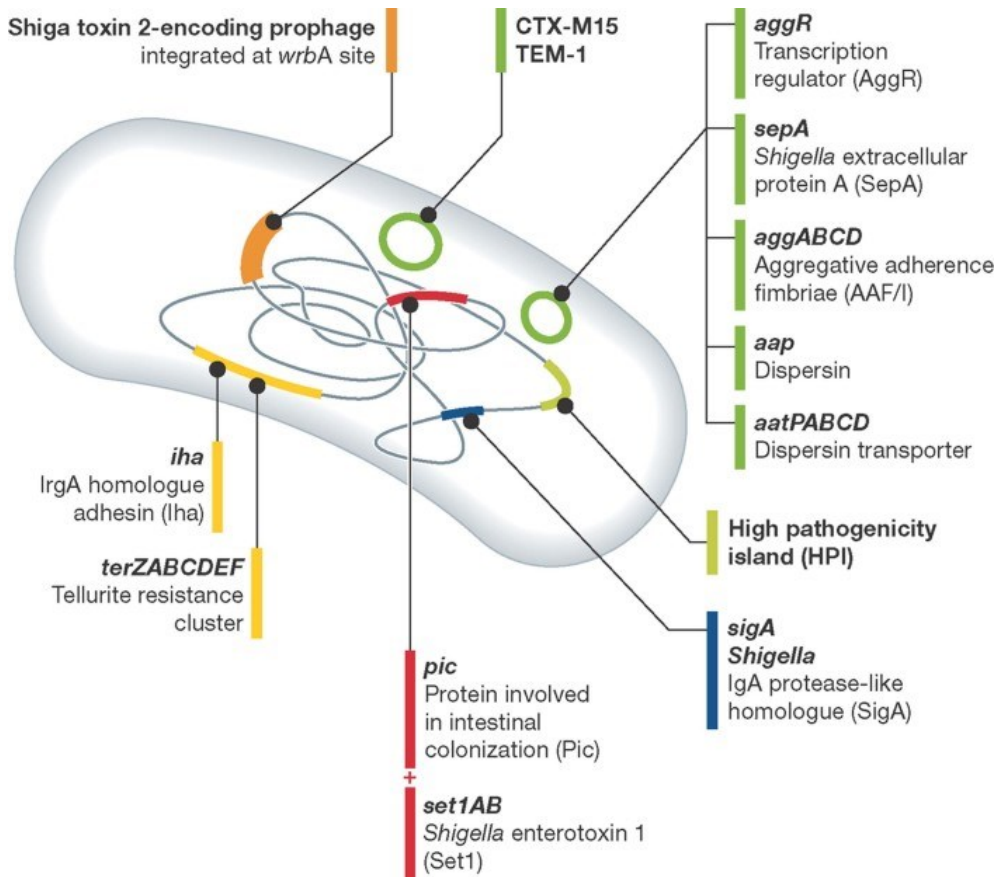


Figura 4. Factores de patogenicidad de la cepa emergente O104:H4 (Karch *et al.*, 2012).

Así, esta cepa O104:H4 poseía las características específicas de una *E. coli* enteroagregativa pero, además, había adquirido la habilidad de producir la variante 2a de la toxina Stx (Bielaszewska *et al.*, 2011), lo que la hacía especialmente virulenta (Fig.5). Se ha visto que el fago Stx adquirido por esta cepa está estrechamente relacionado con otro fago Stx de una cepa *E. coli* O111 (Laing *et al.*, 2012), lo que sugiere que éste fue inducido y liberado de otra cepa STEC y que, tras un período indeterminado de tiempo, lisogenizó a la cepa de Alemania (Muniesa *et al.*, 2012). Aunque el origen del fago Stx de esta O104:H4 es desconocido, estudios recientes indican que es muy similar a fagos Stx encontrados en cepas STEC aisladas del ganado en Alemania (Beutin *et al.*, 2013). Pero no se pueden dejar de investigar otras posibles fuentes del fago Stx que puedan explicar mejor el origen y la epidemiología de esta cepa.



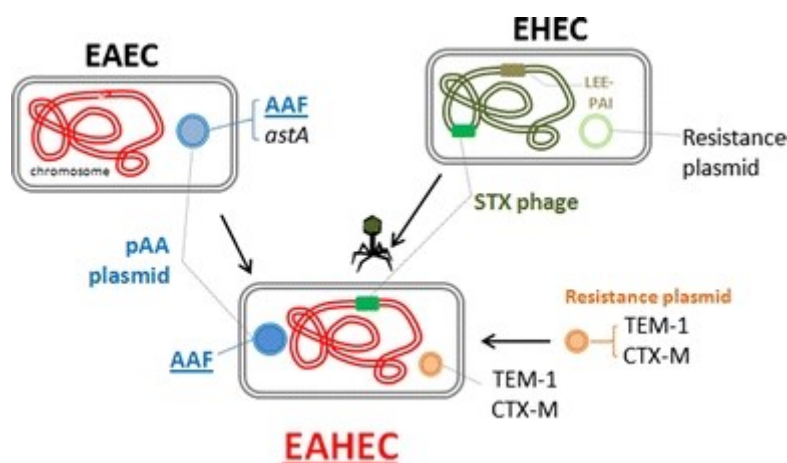


Figura 5. Origen de la cepa O104:H4 patógena (Brzuszkiewicz *et al.*, 2011).

### 1.5. Transmisión

La transmisión de EHEC y de otras cepas patógenas de *E. coli* se debe principalmente al consumo de alimentos y aguas contaminadas, transmisión de animales a personas y de persona a persona (Fig.6). El ganado bovino es uno de los mayores reservorios de *E. coli* O157:H7 y de otras cepas STEC de diferentes serotipos, y una de las principales causas de infecciones en humanos (Caprioli *et al.*, 2005), aunque también se han aislado en otros animales como cabras, ovejas y, con menos frecuencia, en cerdos y pollos (World Health Organization, 1998). Además, los animales domésticos pueden ser portadores asintomáticos de STEC.

De esta manera, STEC puede entrar en la cadena alimentaria a partir de diferentes orígenes animales, ya sea a través de carne cruda o insuficientemente cocinada o de leche sin pasteurizar (Gyles, 2007). En ocasiones, los alimentos se contaminan durante la cadena de procesamiento o producción, debido a la falta de higiene de los trabajadores o del equipo (por ejemplo, *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir durante ciertos períodos del tiempo en el acero inoxidable y el plástico). Los alimentos son, pues, el modo principal de transmisión a seres humanos (Mead *et al.*, 1999). Otros alimentos implicados en los brotes causados por STEC son las frutas y los vegetales como lechuga, col, espinacas, rábanos, pepinos o brotes vegetales, así como mayonesa, yogur y zumos sin pasteurizar, productos ácidos que pueden ser colonizados por O157:H7, que puede sobrevivir unos días a pHs de hasta 3 o 4 (Erickson y Doyle, 2007). En el caso de vegetales, la contaminación parece provenir de contaminación fecal del agua usada para el riego, de la tierra o el abono usado para fertilizar las plantas o del

medio ambiente donde crecen los vegetales. Tampoco se puede descartar que se produzca contaminación por STEC durante su procesamiento o distribución.

Otra vía de transmisión de STEC es el agua, ya sea por ingestión de agua contaminada (posiblemente contaminada con heces de animales o humanos y no sometida a un correcto proceso de desinfección) (Meng y Doyle, 1998), o por el uso de aguas recreacionales o agua de riego contaminada en campos de cultivo. La transmisión también puede ser de persona a persona, sobretodo en hospitales y guarderías, o debida a los manipuladores de alimentos (Tarr, 1995), así como directamente de animales a personas en visitas a granjas o zoológicos (Rangel *et al.*, 2005).

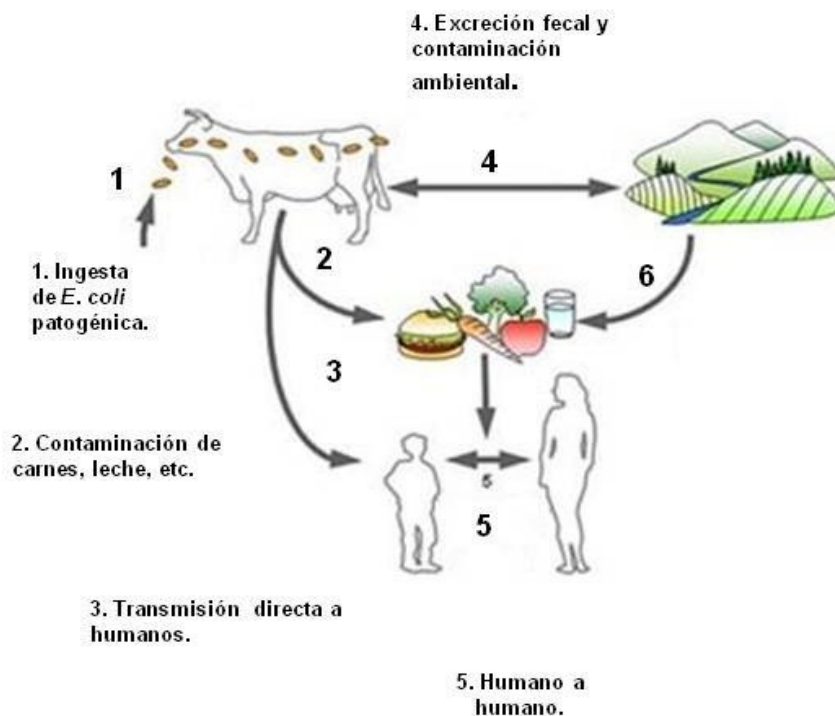


Figura 6. Vías de transmisión *E. coli* patógenas (<http://gabrielescritoriobiologico.blogspot>)

### 1.6. Factores de virulencia de STEC

Las cepas de STEC presentan una amplia batería de factores de virulencia. Las funciones precisas de algunos de dichos factores no se conocen en su totalidad, aunque estudios epidemiológicos sugieren que la asociación entre los factores de virulencia puede incrementar la capacidad de algunos serotipos de causar enfermedades en humanos (Boerlin *et al.*, 1999). El ejemplo más claro es la producción de una o más

toxinas Shiga (Stx), consideradas como el mayor factor de patogenicidad de STEC y responsables de múltiples daños en las células eucariotas, que se explicarán a continuación.

### 1.6.1. La toxina Shiga o Stx

La Stx constituye el principal factor de virulencia de las cepas STEC. Es una holotoxina de tipo AB<sub>5</sub>, formada por una subunidad A de 32 kDa, que constituye el centro catalítico, y cinco subunidades B de 7,7 kDa cada una (Fig.7), que se encargan de la unión a los receptores de superficie en la célula eucariota y del posterior transporte de la subunidad A al citoplasma de la célula (Fraser *et al.*, 2004).

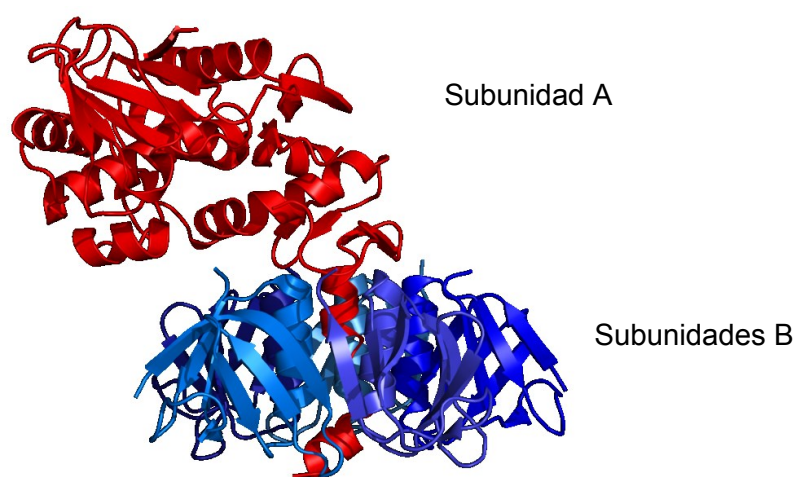


Figura 7. Estructura tridimensional de la Stx (Schmidt *et al.*, 1999).

De esta manera, Stx entra en el tracto intestinal a través de las células intestinales, donde actúa sobre los glóbulos blancos de la submucosa, provocando una reacción inflamatoria y un incremento de la expresión del receptor. Por otro lado, Stx también se une a receptores endoteliales de membrana e internaliza la subunidad A usando la maquinaria de señalización y la cascada enzimática de la célula huésped (O'Loughlin y Robins-Browne, 2001). La subunidad activa A es endocitada y posteriormente desplazada al endosoma, y después al retículo endoplasmático. Finalmente llega al citosol, donde actúa con su función N-glicosidasa, que altera la función de los ribosomas de la célula huésped, inhibiendo así la síntesis de proteínas (Johannes y Römer, 2010) (Fig.8).

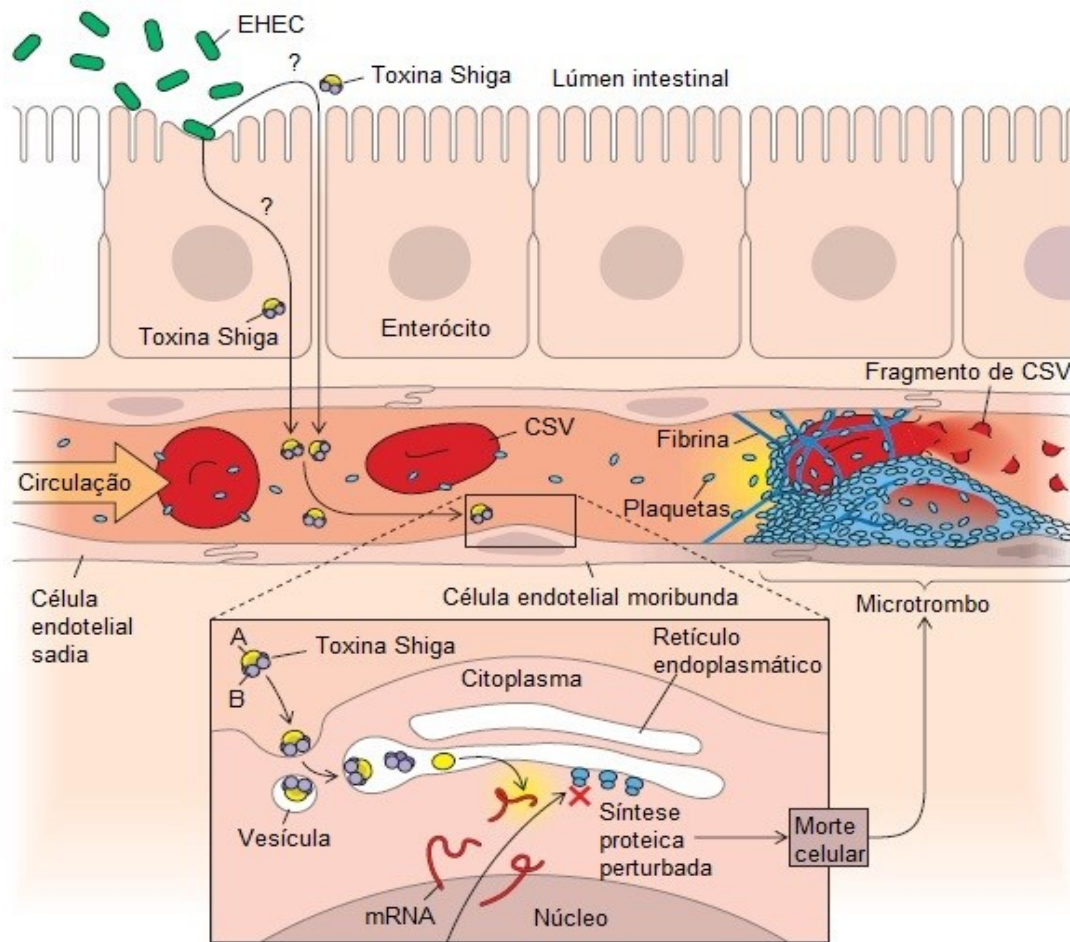


Figura 8. Mecanismo de acción de la Stx (<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine.htm>).

Por tanto, podemos decir que la toxina Stx afecta a la célula eucariota inhibiendo la síntesis de proteínas, creando una reacción inflamatoria y activando una cascada de señalización que conducirá a la muerte celular. La toxina Stx también puede ser transportada por sangre al riñón. En el riñón, la actividad de la toxina, mediante los mismos procesos celulares, causa la insuficiencia renal aguda y la destrucción glomerular, así como la anemia y la trombocitopenia típicas del síndrome urémico hemolítico, que hacen que las cepas STEC sean potencialmente mortales para el ser humano (Paton y Paton, 1998).

Se distinguen dos tipos principales de Stx, la Stx1 y la Stx2. La Stx1 es prácticamente idéntica a la toxina de *Shigella dysenteriae* de tipo I y hasta la fecha existen 3 subtipos (Stx1a, Stx1c y Stx1d), muy similares entre sí. La Stx2 comparte el 56% de homología con la secuencia de Stx1 (Strockbine *et al.*, 1986) y actualmente se

conocen 7 subtipos (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g) (Scheutz et al., 2012), que comparten entre 84-99% de homología, siendo un grupo bastante más heterogéneo que Stx1. Los subtipos de Stx2 se distinguen entre sí, además de por la secuencia aminoacídica, por la reactividad inmunológica, la actividad biológica y el receptor al que se unen. Dentro de cada subtipo, se distinguen además variantes, que difieren en uno o más aminoácidos del prototipo. El receptor principal de Stx1 y de Stx2 es el glicosfingolípidio Gb3 (globotriaosilceramida), excepto el subtipo Stx2e, que se une al Gb4 (globotetraosilceramida). La unión a diferentes receptores hacen que la toxina pueda unirse a diferentes tipos celulares, causando el efecto citotóxico (Johannes y Römer, 2010).

Generalmente, Stx2 está más asociada a enfermedades graves en humanos que Stx1 (Boerlin *et al.*, 1999). Las diferencias estructurales consistentes en el hecho de que la subunidad A en Stx2 sea más accesible que en Stx1 podría dar lugar a diferentes mecanismos de acción en las dos clases de Stx, explicando así las diferencias en la patogenicidad de las toxinas (Fraser *et al.*, 2004).

Por último, decir que los genes de las toxinas Stx están codificados en el genoma de bacteriófagos de tipo lambdaoide, denominados fagos Stx, tal como explicaremos más adelante.

### **1.6.2. Otros factores de patogenicidad**

Otros genes, mayoritariamente codificados en elementos genéticos móviles como plásmidos, profagos o islas de patogenicidad, también se han relacionado con la virulencia de STEC (Fig.10). Algunos de ellos son:

- **LEE**: la intimina, codificada por el gen *eae*, es una proteína de membrana externa (OMP) que permite la adhesión del patógeno a la célula intestinal, con la consiguiente eliminación de las microvellosidades y la invasión de la bacteria. Se han descrito hasta 21 variantes de esta proteína (Jores *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2006; Mora *et al.*, 2007).

Este gen se localiza en una isla de patogenicidad llamada LEE ("*locus of enterocyte effacement*") (McDaniel *et al.*, 1995), junto con otros factores de virulencia asociados a la adhesión y la invasión de los enterocitos.

De esta manera, LEE comprende todo un grupo de genes necesarios para la inducción de una lesión histopatológica característica de las infecciones causadas por EHEC y EPEC, conocida como adhesión y borrado de los enterocitos o “*attaching and effacing*” (A/E). Consiste en la capacidad del patógeno para colonizar la célula epitelial, utilizando la maquinaria de la propia célula epitelial (McDaniel *et al.*, 1995; Garmenia *et al.*, 2005), y mediante la unión íntima entre la bacteria y la membrana del enterocito (gracias a la intimina). A partir de aquí se inician los cambios estructurales en la célula, que consisten en la acumulación de la actina polimerizada en el polo apical, la formación de un pedestal y la eliminación de las microvellosidades, que provocaran la destrucción (o borrado) del epitelio intestinal (Caprioli *et al.*, 2005) (Fig.9).

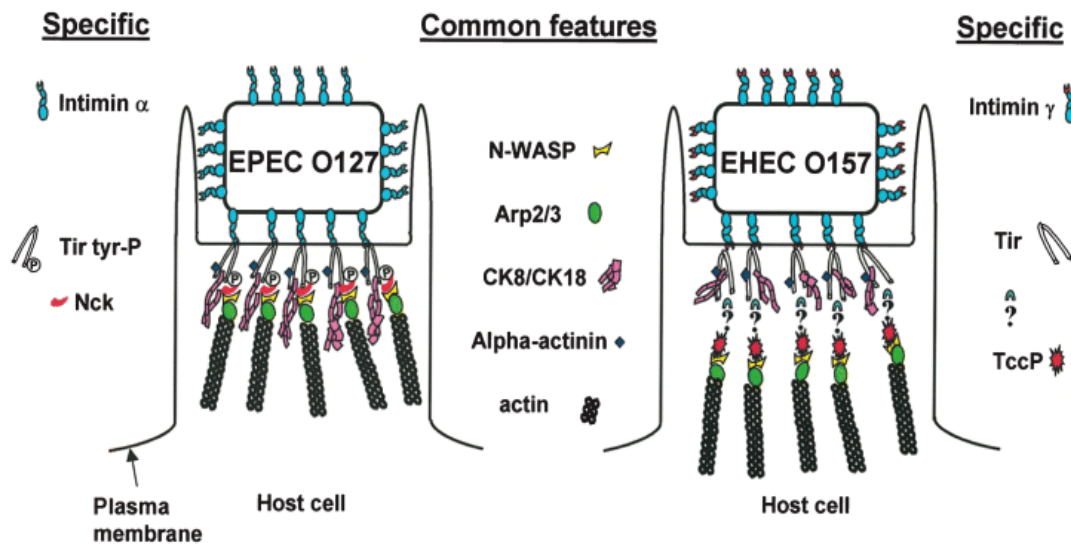


Figura 9. Moléculas implicadas en la cascada de señalización para la polimerización de la actina en EPEC O127 y EHEC O157 en la formación de las lesiones A/E (Garmenia *et al.*, 2005).

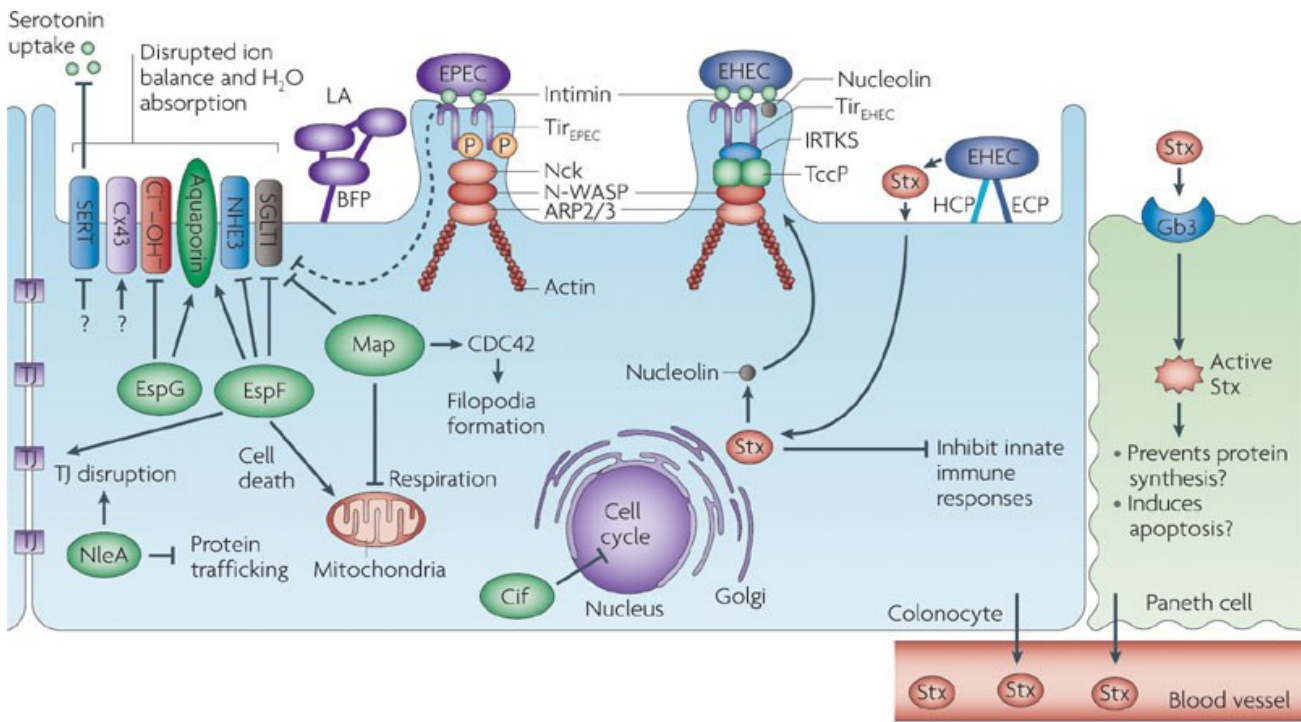
LEE está organizado en tres módulos, que codifican para diferentes proteínas que participarán en este proceso. El primero codifica el sistema de secreción de tipo III (SST3), que transporta las moléculas efectoras. El segundo módulo codifica un sistema de translocación de proteínas y el tercero es el sistema de adhesión a las células epiteliales, formado por la intimina (gen *eae*) y su receptor Tir (McDaniel *et al.*, 1995; Elliott *et al.*, 1998). La regulación génica es compleja y depende de diferentes factores como la acción de diversos reguladores, el “*quorum sensing*” o las condiciones ambientales (Garmenia *et al.*, 2005).

Además, hay otras proteínas efectoras codificadas en otras islas de patogenicidad o en fagos atemperados que incrementan la virulencia de la cepa que serán trasladadas a la célula huésped mediante el SST3 codificado en LEE.

- Fímbrias: algunos ejemplos son las ECP o pili común de *E. coli* (Rendón *et al.*, 2007), las HCP o pili de las EHEC (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2007), las ELF o fímbrias unidas a laminina (Samadder *et al.*, 2009), y las SfpA, que son unas fímbrias codificadas en un plásmido de cepas atípicas EHEC O157:NM que fermentan sorbitol (Brunder *et al.*, 2001), entre otras.
- Adhesinas: dentro de este grupo encontramos, por ejemplo, la adhesina codificada por el gen *saa*, que se encuentra en un plásmido. Permite la unión al enterocito en cepas patógenas que no tienen la intimina para unirse al epitelio intestinal (cepas LEE negativas) (Paton *et al.*, 2001; Galli *et al.*, 2009). También podrían participar en este proceso de adhesión otras Omp (como la OmpA o proteína A de membrana externa), el factor Efa1 característico de EHEC, EhaA (proteína autotransportadora característica de algunas cepas O157:H7 involucrada en la adhesión y la formación de biofilms) (Wells *et al.*, 2008), Sab (producida por una cepa STEC O113:H21 muy virulenta) (Herold *et al.*, 2009), el producto del gen *A* regulado por hierro (*Iha*) e, incluso, el LPS de membrana (Paton y Paton, 1998), entre otros.
- Toxinas: además de la toxina Shiga, las cepas de STEC pueden codificar la síntesis de otras toxinas, como puede ser la enterohemolisina (Ehly), codificada por el gen *ehxA*, localizado en el plásmido pO157. Actúa provocando un sangrado en el lumen, característico de la colitis hemorrágica. Otras cepas también pueden producir la “*Cytolethal distending toxin*” o Cdt (de la que se hablará más adelante y en la que hemos centrado este trabajo), la citotoxina subtilasa (SubAB) o la toxina enteroagregativa termoestable (EAST1).
- Factores necrotizantes (CNF1, CNF2 y CNF3): las *E. coli* patógenas que producen estos factores de virulencia se denominan NTEC.
- Proteasas: algunas cepas STEC pueden producir proteasas como la EspP (serin proteasa que inhibe el factor de coagulación V, evitando que se detenga la hemorragia) o la nleA-H, metaloproteasas y catalasas/peroxidasas (KatP).



- Resistencia a pHs ácidos, ureasa, flagelos (que permiten la movilidad), etc.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 10. Resumen de algunos de los mecanismos y factores de patogenicidad más importantes de las *E. coli* patogénicas (Croxen y Finlay, 2010).

### 1.7. Elementos genéticos móviles en STEC

Muchos de los factores de virulencia en *E. coli* se encuentran codificados en elementos genéticos móviles, ya sean plásmidos, bacteriófagos o transposones, entre otros. Estos elementos suponen una fuente inagotable de genes o fragmentos de diversos orígenes, actuando como vectores en la transmisión horizontal de éstos de unas cepas a otras y mediando la adquisición o la pérdida de genes, así como provocando diferentes cambios genéticos por inserción, pérdida o translocación. De esta manera, se incrementa la posibilidad de aparición de nuevas cepas, ya sean patógenas o no.

Se distinguen cinco grupos de elementos genéticos móviles, descritos a continuación:

- Plásmidos: son moléculas de ADN extracromosómico generalmente circular y de doble cadena, que constituyen un elemento replicativo autónomo (Lederberg, 1998). Su



tamaño es muy variable y están presentes en la mayoría de grupos bacterianos, así como en algunas levaduras. Se pueden transferir, generalmente por conjugación aunque también por transformación, de unas especies bacterianas a otras y el número de copias por célula es muy variable (desde una hasta cientos de copias) (Tomalsky *et al.*, 1992).

En general, codifican genes que confieren ciertas ventajas adaptativas a la bacteria huésped. Por ejemplo, pueden contener genes de resistencia a antibióticos (Panhotra *et al.*, 1981; Venturini *et al.*, 2013) y a metales pesados (Gómez-Sanz *et al.*, 2013), codificar enzimas para la utilización de fuentes inusuales de carbono o para requerimientos metabólicos especiales, síntesis de diferentes factores de patogenicidad (como ya hemos visto anteriormente: adherencia, toxinas, fimbrias, etc) o codificar genes que participan en la replicación o la movilidad.

Los plásmidos se usan como vectores de clonaje de diferentes genes en técnicas de recombinación de ADN gracias a que presentan numerosas ventajas respecto a otros vectores: se pueden “fabricar” a medida, pueden ser muy pequeños, no dañan ni matan a la célula huésped, y se pueden obtener y purificar fácilmente (Feimbaum, 1998). Además, suelen contener genes de resistencia a antibióticos, muy útiles a la hora de seleccionar los recombinantes (Mongkolsuk *et al.*, 1993).

- **Transposones:** son secuencias de ADN que pueden moverse o “saltar” (de ahí su nombre de “genes saltarines”) de una parte a otra del genoma o de un genoma a otro de manera autónoma y sin recombinación específica de sitio en un proceso denominado transposición. Los transposones provocan cambios genéticos y mutaciones (Zhang *et al.*, 2011), puesto que al cambiar de posición pueden arrastrar genes codificantes del cromosoma de un lugar a otro, o insertarse en medio de un gen y hacer que pierda su funcionalidad.

Según su estructura, los transposones se pueden clasificar en dos grupos: transposones simples o elementos de inserción (IS) y transposones compuestos (Tn). Los primeros están formados por una región central que codifica la transposasa, enzima necesaria para la transposición, y unas secuencias repetidas invertidas (IR) en los extremos. Los transposones compuestos están formados por un elemento de inserción o IS en cada extremo (que contiene la información para la transposasa) y una región central que contiene otros genes, como genes de resistencia a antibióticos (Fig.11).



se encuentran flanqueadas por regiones cortas de repeticiones directas (DR) cuyas secuencias se parecen a las regiones *att* de los fagos o por secuencias IS, y también contienen genes de integrasas o transposasas (Hacker *et al.*, 1997), hecho que evidencia su potencial papel como elemento móvil.

Así, destaca el locus LEE de STEC (que codifica los factores de virulencia que participan en las lesiones A/E, como se ha indicado anteriormente), puede contener integrasas activas y regiones flanqueantes homólogas a zonas *att* (Perna *et al.*, 1998), lo que sugiere que puede ser un elemento móvil, gracias a un proceso de recombinación específica (Muniesa *et al.*, 2006). Además, se ha sugerido que la presencia de integrasas relacionadas en el cromosoma de *E. coli* también podrían participar en la dinámica y la movilización de las islas de patogenicidad (Muniesa *et al.*, 2006).

El hecho de que diversas PAI se encuentren distribuidas en diferentes grupos clonales y serotipos, con un contenido G+C similar y tengan características propias de elementos móviles, indica que se movilizan por transferencia horizontal, tal y como han sugerido varios autores (Muniesa *et al.*, 2006; Konczyk *et al.*, 2008; Schmidt, 2010).

- **Bacteriófagos:** se trata de virus que infectan exclusivamente a bacterias. Fueron descubiertos en 1917 por Félix d'Hérelle, y desde entonces se utiliza el nombre de bacteriófago o fago, que proviene de "*bacteria*" y "*phagetón*" (ingerir, devorar en griego). Igual que el resto de virus, los fagos son parásitos intracelulares obligados que utilizan la maquinaria de la célula huésped para replicarse (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Se componen de una cápside proteica que contiene el material genético, que puede ser ADNss (ej. Phi X174), ADNds (ej.  $\lambda$ , T4, T7), ARNss (ej. MS2), o ARNds (ej. Phi6), circular o lineal, y de tamaño variable (entre 5 y 500 kb). Pueden tener cola, contráctil o no, que usan para la inyección del ácido nucleico dentro de la célula, y miden entre 20 y 200 nm.

En la actualidad existen numerosas familias de fagos, que se agrupan en función de su morfología, tipo de ácido nucleico, espectro de huésped y otras características (Fig.12).

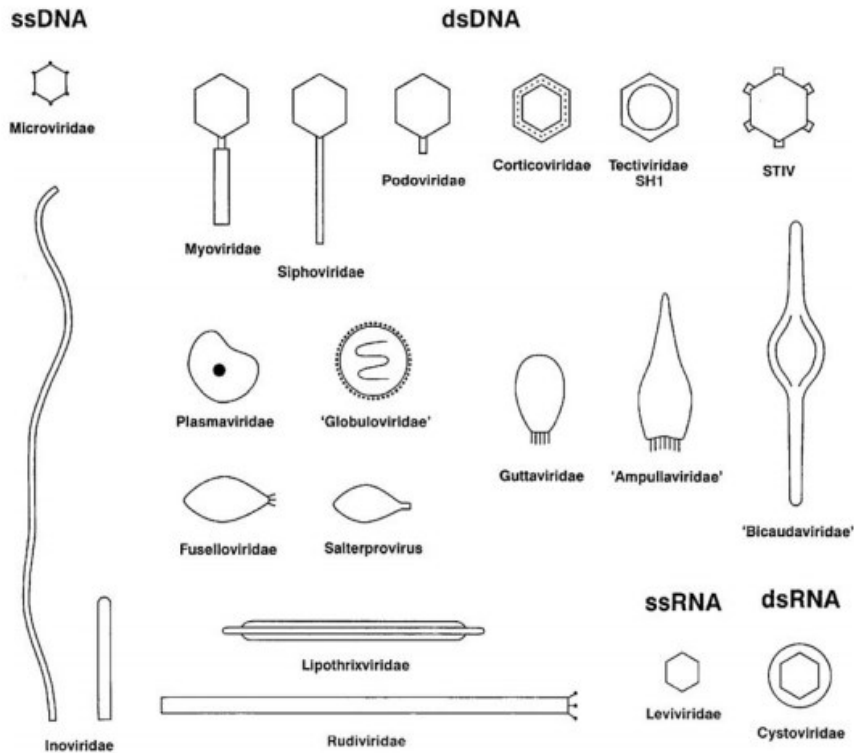


Figura 12. Familias de bacteriófagos (Ackermann, 2009).

En función de su ciclo vital, se distinguen los fagos virulentos, que al entrar en la célula huésped inician la multiplicación usando la maquinaria celular y finalmente lisan la célula y liberan las partículas fágicas, y los fagos atemperados o atenuados, que además de multiplicarse mediante el ciclo lítico, pueden integrarse en el cromosoma de la célula huésped (fenómeno denominado lisogenia), entrando en un período quiescente o de latencia, en el que se denominan profagos. Sólo los fagos atemperados se pueden considerar elementos genéticos móviles. El ciclo vital de los fagos se explicará con detalle más adelante.

Los bacteriófagos son microorganismos ubicuos, ya que han sido encontrados en prácticamente todo tipo de poblaciones bacterianas, en muchos ambientes diferentes, incluso en condiciones extremas (elevadas y bajas temperaturas, ambientes ácidos, medio acuático o desértico, etc). Se estima que en el mar hay aproximadamente  $10^9$  partículas víricas por ml.

Una de las aplicaciones más importantes de los bacteriófagos es la terapia fágica (Carlton, 1999), puesto que por su propia naturaleza el fago es capaz de lisar y eliminar las células bacterianas. El primer uso de un bacteriófago como agente terapéutico fue en 1917 para tratar la disentería bacteriana. Su uso contra diferentes infecciones bacterianas (ya fueran infecciones en la piel, el sistema respiratorio, el

gastrointestinal, tejidos blandos, etc) se extendió hasta los años 30, pero tras la II Guerra Mundial empezaron a utilizarse los antibióticos de amplio espectro, y se perdió el interés en las aplicaciones terapéuticas de los fagos.

Pero la aparición de numerosas cepas resistentes a los antibióticos (se estima que un 70% de cepas que causan infecciones en los hospitales son resistentes al menos a uno de los antibióticos más comunes) ha vuelto a presentar la necesidad de buscar alternativas terapéuticas y los fagos aparecen de nuevo como buenos candidatos para combatir las infecciones bacterianas. Por todos estos motivos, se han retomado las investigaciones en el uso de los bacteriófagos como terapia, y en la actualidad se pueden encontrar numerosos estudios basados en fagos (Klem *et al.*, 2013; Lecion *et al.*, 2013; Cairns *et al.*, 2009) y en proteínas fágicas (Rodríguez-Rubio *et al.*, 2013a y 2013b).

### **1.8. Bacteriófagos portadores de genes de virulencia**

Recientes secuenciaciones de genomas completos de diversas cepas de *E. coli* indican que una parte importante de su genoma son bacteriófagos y que éstos son un importante mecanismo en la evolución y adaptación de *E. coli* a nuevos huéspedes mediante transferencia horizontal de genes de virulencia (Boyd & Brüssow, 2002).

Freeman fue el primero en demostrar el papel de los fagos en la modificación de la virulencia bacteriana. Descubrió que la cepa no toxigénica de *Corynebacterium diphtheriae*, al ser infectada por un bacteriófago, se convertía en una cepa virulenta productora de la toxina diftérica por la adquisición de este gen (Freeman, 1951; Tinsley *et al.*, 2006). Este proceso de transferencia horizontal de genes mediante fagos se denomina transducción, y fue descubierto en 1952 (Zinder y Lederberg, 1952), siendo el último de los sistemas de transferencia genética bacteriana en conocerse. La transducción se puede definir como la transferencia genética desde una célula donadora a otra receptora mediatizado por bacteriófagos que contienen ADN de la donadora.

Existen dos tipos de transducción, con características diferenciadas, que se describen a continuación:

- a) Transducción generalizada: este proceso se produce como consecuencia de infecciones por fagos virulentos, donde un fragmento de ADN de la bacteria se introduce en una partícula fágica durante la fase de multiplicación, generalmente sin acompañarse de ADN del propio fago. Estas partículas se denominan de

transducción generalizada, partículas infecciosas o pseudoviriones. Se puede introducir aleatoriamente y con la misma frecuencia cualquier fragmento del ADN de la cepa donadora, y por eso se dice que es una transducción “generalizada” (Thierauf *et al.*, 2009).

- b) Transducción especializada: en este caso, la transducción se produce como consecuencia de la inducción y excisión de un profago y la consiguiente entrada en el ciclo lítico. La enzima encargada de la excisión puede cortar más allá de los límites del profago, de forma que un fragmento de ADN cromosómico de la cepa donadora próximo al ADN del fago es encapsidado y transportado a la célula receptora (Miller, 2004). Una vez allí, la partícula de transducción se suele convertir en lisogénica e integrarse en el cromosoma, adquiriendo así un nuevo carácter procedente de la cepa donadora (Fig.13).

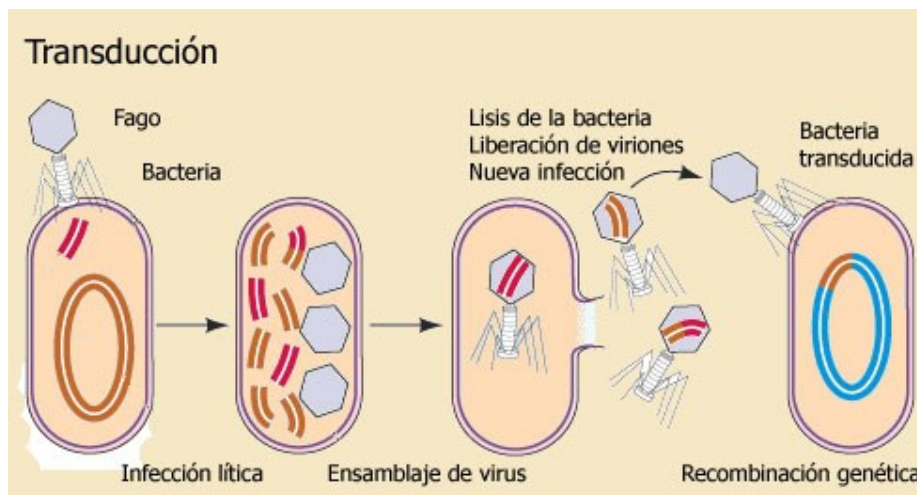


Figura 13. Transducción especializada (<http://alexamolinavalenzuela.blogspot.com.es>).

Este es el proceso por el cual los fagos pueden transducir genes de unas cepas a otras. La aparición de nuevas cepas patógenas, así como el hecho de que muchas cepas bacterianas contengan regiones adyacentes a determinados genes con elevada homología a genes de bacteriófagos, corrobora la hipótesis de que muchos genes que codifican factores de virulencia se encuentran en el genoma de bacteriófagos y se transducen de unas cepas a otras en el medio ambiente por este proceso de transferencia horizontal. En los últimos años, se han descrito numerosos fagos que contienen en su genoma factores de patogenicidad.

Uno de los más estudiados es el fago Stx. En efecto, los genes de la Stx forman parte del genoma de fagos lamboides atemperados (fagos Stx) que se encuentran funcionales o crípticos en el cromosoma bacteriano (Herold *et al.*, 2004). La diseminación de los fagos Stx se presenta como el mecanismo más probable de emergencia de nuevos serotipos de STEC, tal y como se ha demostrado “*in vitro*” (Schmidt *et al.*, 1999, James *et al.*, 2001) e “*in vivo*” (Acheson *et al.*, 1998; Tóth *et al.*, 2003).

Estudios previos enfocados al aislamiento de cepas STEC y fagos Stx (Muniesa and Jofre, 1998; Muniesa *et al.*, 2000; Muniesa *et al.*, 2004a, 2004b, García-Aljaro *et al.*, 2008), demostraron que los fagos Stx se encuentran presentes en elevadas proporciones tanto en cepas de origen clínico, animal y en el medio extraintestinal. Además, se ha observado que el 5% del genoma secuenciado de O157:H7 está compuesto por profagos crípticos o funcionales. Esto apoyaría la hipótesis de que otros caracteres de virulencia están codificados en fagos. Sin embargo, hay muy poca información sobre otros serotipos, incluidos aquellos serotipos más virulentos en Europa (O157:H7, O26, O103, O145 y O111). Además, parece que podría haber una asociación entre el número y la combinación de algunos efectores de tipo III, la capacidad de generar SUH, y el potencial epidémico (Tobe *et al.*, 2006) y recientemente se ha relacionado a los fagos Stx con la expresión del “*Locus of Enterocyte Effacement*” o LEE (Xu *et al.*, 2012). En los últimos años, se han dedicado esfuerzos a estudiar otros fagos que transportan otros caracteres de virulencia relacionados con la patogenicidad de *E. coli* en el medio extraintestinal.

De esta manera, aunque la Stx juega un papel crucial en la severidad de los síntomas y las complicaciones de las patologías generadas por EHEC (Karmali, 1989), existen un amplio repertorio de proteínas efectoras secretadas vía el sistema de secreción de tipo III (SST3) que también se cree esenciales para la virulencia de EHEC (Garmendia *et al.*, 2004).

El genoma de EHEC también presenta otros loci intercambiables a lo largo de todo el cromosoma y situados mayoritariamente dentro del genoma de profagos lamboides (Tobe *et al.*, 2006; Loukiadis *et al.*, 2008). Este es el caso de ciertas proteínas efectoras de tipo III, como la nleA-H (Creuzburg *et al.*, 2005) o el factor de inhibición del ciclo celular (“*cell cycle inhibiting factor*” o Cif) (Nougayrède *et al.*, 2005; Loukiadis *et al.*, 2008) que es translocado al interior de la célula vía SST3.

Además de las Stx, las cepas de *E. coli* patogénicas pueden producir otras toxinas que, según la reciente literatura, también están codificadas, solas o en combinación con otros genes, en el extremo 3' de algunos fagos o profagos. Este es el caso de la Cdt,

("cytolethal distending toxin") (Janka *et al.*, 2003; Bielaszewska *et al.*, 2005;) Asakura *et al.*, 2007; Tóth *et al.*, 2009).

Los fagos que codifican factores de virulencia (ya sean proteínas efectoras de tipo III secretadas por el SST3, toxinas, factores de adherencia, etc), suponen un peligro potencial tanto en ambientes clínicos como en el medio ambiente, puesto que una vez liberados al medio, tienen la capacidad de transducir uno o varios de estos genes de patogenicidad a cepas no patógenas, convirtiéndolas en virulentas y provocando la aparición de nuevas cepas emergentes con potencial capacidad para generar brotes e incluso epidemias a gran escala con elevada mortalidad (Muniesa *et al.*, 2012). Por tanto, se necesita más investigación en la inducción de fagos portadores de genes de virulencia y de la presencia y la diseminación de éstos en el medio extraintestinal.

### **1.9. Infección y replicación de los fagos**

El inicio de la infección del fago consiste en la inyección del ADN fágico en la célula huésped, donde utiliza la maquinaria celular para multiplicarse y finalmente provocar la lisis bacteriana y liberar las nuevas partículas fágicas al medio. En este proceso, se distinguen varias fases:

- 1) Adsorción: el fago se une a receptores específicos en la membrana celular mediante las fibras de la cola o por alguna estructura análoga, hasta constituir una unión irreversible. Por ejemplo, en el caso de los fagos Stx, se han descrito dos receptores celulares: LamB y FadL (Watarai *et al.*, 1998). La unión a determinados receptores determinará la especificidad de huésped de los diferentes fagos (Hansen *et al.*, 2007).
- 2) Penetración: consiste en la inyección del ácido nucleico en el interior de la bacteria. A partir de este momento, el fago pasará a denominarse virión. Una vez dentro del citoplasma, el genoma fágico generalmente se circulariza por la unión de extremos cohesivos, gracias a ligasas presentes en el propio huésped. De esta manera, el ADN del fago ya no es lineal y es menos sensible a la digestión por endonucleasas de la bacteria (Heskowitz y Hagen, 1980). Además, posee bases modificadas que también evitan la degradación por nucleasas bacterianas.

A partir de aquí divergen los mecanismos según el fago lleve a cabo el ciclo lítico o el ciclo lisogénico. En el **ciclo lítico** (Fig. 14), el virión paralizará la transcripción



bacteriana y usará la maquinaria de la célula para la replicación de su ADN y la síntesis de todos los componentes proteicos víricos. Así, después de la fase de penetración, distinguimos:

- 3) Replicación y síntesis de componentes virales: usando los mecanismos y las enzimas de la bacteria huésped.
- 4) Ensamblaje: todas las proteínas de la cápside se unen e incorporan el nuevo ADN fágico sintetizado, creando nuevas partículas fágicas infectivas.
- 5) Lisis celular: se sintetizan unas enzimas que degradan la membrana y la pared celular de manera que provocarán la lisis bacteriana y la liberación de las partículas fágicas.

En el **ciclo lisogénico** (Fig. 14), el ADN del fago es inyectado, pero en vez de iniciar su replicación, normalmente se integra en el genoma bacteriano por recombinación específica de sitio y permanece en forma latente (también denominado estado quiescente o de profago), replicándose junto al cromosoma de la célula, aprovechando su maquinaria transcripcional. Generalmente, los fagos presentan lugares de integración específicos en el cromosoma bacteriano. Se han descrito diversos para los fagos Stx (Recktenwald y Schmidt, 2002; Shaikh y Tarr, 2003; Serra-Moreno *et al.*, 2007). También se han descrito algunos fagos, como el P1, que en vez de integrarse en el cromosoma bacteriano, circularizan y se mantienen en el citoplasma de la célula actuando como plásmidos.

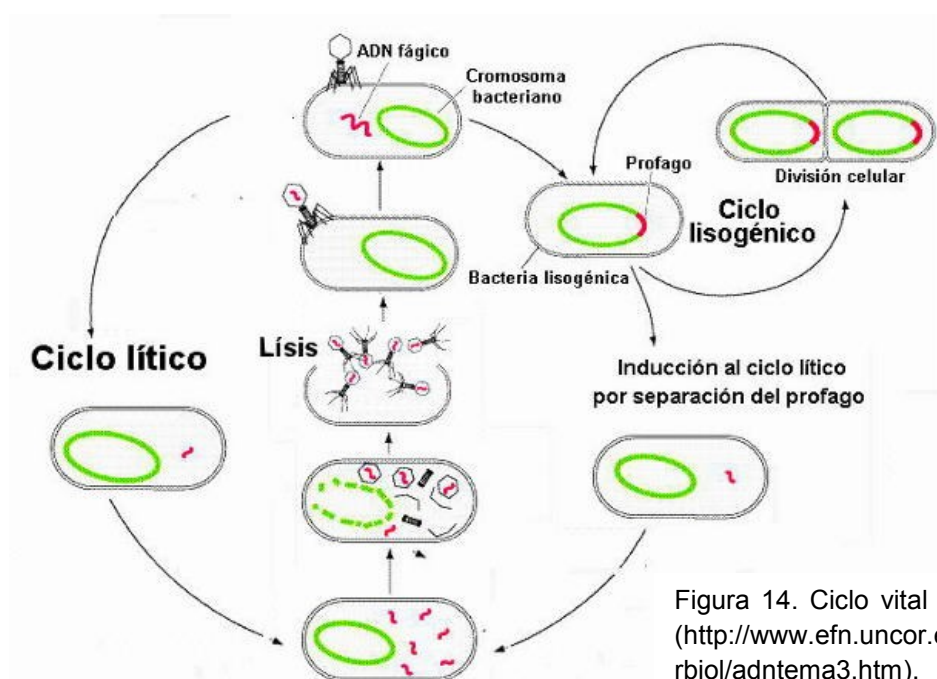


Figura 14. Ciclo vital de un bacteriófago (<http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/introbiol/adntema3.htm>).

### 1.9.1. Ciclo lítico vs. ciclo lisogénico en los fagos atemperados

Los fagos capaces de llevar a cabo ambos ciclos son los fagos atemperados. Algunos de los bacteriófagos portadores de genes de patogenicidad, como es el caso de los fagos Stx, son fagos atemperados. Los fagos atemperados, una vez integrados en el cromosoma de la bacteria huésped, permanecen en ese estado de latencia como profagos (replicándose como parte del propio cromosoma con la maquinaria celular, en un proceso de transmisión vertical) durante mucho tiempo, hasta que algún estímulo externo provoca su excisión y se inicia el ciclo lítico.

Así, una vez entran en la célula huésped, los fagos atemperados pueden seguir dos vías diferentes de infección: ciclo lítico o ciclo lisogénico. El hecho de escoger entre una vía u otra depende de numerosos factores, entre ellos los niveles de determinadas proteínas reguladoras codificadas por el fago. Sistemas similares han sido descritos para diversos fagos atemperados (Heskowitz y Hagen, 1980; Court *et al.*, 2007).

En el caso de los fagos Stx, que son fagos de tipo lamboide, atendiendo a su regulación genética, la decisión entre la lisis y la lisogenia tras la infección depende de diferentes genes: *cl*, *cII*, *cIII* y *cro*. *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 (Fig.15).

La decisión para establecer la lisis o la lisogenia dependerá de los niveles de CII y CIII. Una alta concentración de estas proteínas permitirá una mayor producción de CI, el bloqueo de la expresión de genes líticos y la expresión de la integrasa para la integración en el cromosoma bacteriano (Kobiler *et al.*, 2005), que permitirá el establecimiento de la lisogenia. Por el contrario, bajas concentraciones de CI activarán la síntesis del antirrepresor Cro (que compite con CI por la unión al promotor pRM) y el fago se inducirá, iniciando el ciclo lítico con la expresión de los genes líticos, proceso en el que participan las proteínas reguladoras N y Q (Oppenheim *et al.*, 2005; Dodd *et al.*, 2005; Court *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2007).

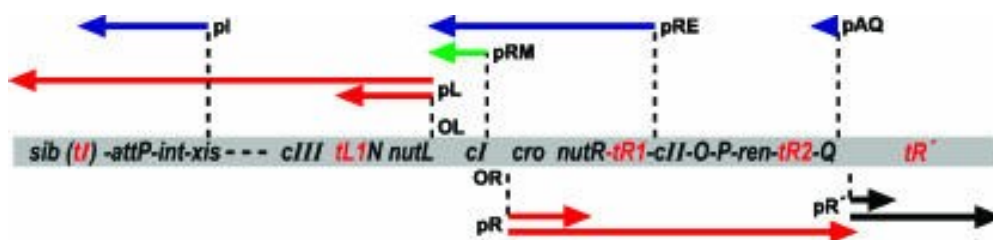


Figura 15. Estructura genética de los fagos lamboides (Court *et al.*, 2007).

Los profagos pueden contener genes adicionales que benefician a la bacteria huésped, ya sean genes de virulencia, de resistencia a antibióticos, de metabolización de determinados compuestos, etc. Al formar parte del genoma bacteriano, pueden ser expresados, cambiando las propiedades de la bacteria. Este fenómeno se conoce como **conversión lisogénica**.

Existen numerosos ejemplos, como el caso de la cepa bacteriana inocua *Vibrio cholerae*, que al incorporar un fago se transforma en la variante virulenta que causa el cólera, o la producción de la toxina en *Corynebacterium diphtheriae*. También los fagos Stx pueden convertir lisogénicamente a su huésped haciendo que expresen *stx* (Smith *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 1984). En el caso de *Salmonella*, se ha demostrado que fagos lisogénicos llevan genes que pueden modificar el antígeno O, que es reconocido en la respuesta inmune. Otros ejemplos son los genes no esenciales *bor* y *lom*, que confieren resistencia al suero e incrementan la supervivencia de la cepa huésped en los macrófagos (Brüssow *et al.*, 2004).

### 1.9.2. Efectos de la integración de fagos atemperados sobre la cepa huésped

La conversión lisogénica, además de la incorporación de nuevos genes, puede tener otros efectos en la bacteria huésped:

- Reorganización cromosómica: los fagos se insertan en el genoma y pueden provocar cambios genéticos, con zonas de elevada frecuencia de recombinación (Hendrix, 2002; Canchaya *et al.*, 2003, 2004).
- Inactivación de genes: si el fago se integra en medio de un gen, éste dejará de ser funcional.
- Lisis de las cepas competentes: los fagos son capaces de regular las poblaciones bacterianas, de manera que una pequeña fracción de la población de lisógenos pueden inducir el profago, activar el ciclo lítico y matar a las cepas bacterianas no lisógenas que significan competencia (Bossi *et al.*, 2003).
- Protección ante nuevas infecciones fágicas: si la bacteria es lisogénica, es poco probable que sea infectada por otros fagos similares (Dodd *et al.*, 2005) según el principio de inmunidad fágica, aunque se han descrito algunas excepciones en el caso de los fagos Stx, donde pueden encontrarse dobles y hasta triples lisógenos (Allison, 2003; Serra-Moreno *et al.*, 2007, 2008).

- “Asimilación” de fragmentos de profagos crípticos: en algunos casos, los profagos pueden quedar atrapados en el cromosoma bacteriano y pasan a ser inactivos, perdiendo su capacidad para inducirse. Entonces se denominan profagos crípticos (Canchaya *et al.*, 2004). Se cree que sólo los genes de estos profagos que proporcionen una ventaja a la cepa huésped se conservarán, y se acabarán manteniendo, formando parte del cromosoma bacteriano.

### 1.9.3. La inducción fágica: de ciclo lisogénico a ciclo lítico

En determinadas situaciones, dependiendo de las condiciones intracelulares y del estrés ambiental, el profago en estado lisogénico puede activar el ciclo lítico, en un proceso llamado inducción. Al activarse el ciclo lítico, en un período corto de tiempo (2-6 h en *E. coli*) el ADN fágico replica y aumenta en dos o tres órdenes de magnitud, de manera que los genes fágicos son fuertemente expresados y aumenta la síntesis de proteínas víricas (Neely y Friedman, 1998; Herold *et al.*, 2004), gracias a promotores que estaban reprimidos durante la lisogenia. La inducción tiene especial importancia en el caso de fagos portadores de genes de toxinas, puesto que incrementa drásticamente la producción de estas toxinas, incrementando la virulencia de la cepa.

Por tanto, la expresión de genes fágicos y la producción de toxinas está fuertemente ligado a la inducción fágica (Kimmitt *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2000). Se pueden distinguir varios tipos de factores de inducción (Muniesa y Schmidt, 2012):

- Antibióticos: algunos antibióticos usados en terapia humana o en la alimentación animal como promotores de crecimiento pueden estimular la inducción de los fagos, como por ejemplo, las quinolonas, la ciprofloxacina o el trimethoprim (Kimmitt *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). La mitomicina C, que daña el ADN por entrecruzamiento de cadenas, es comúnmente usado en el laboratorio como inductor de fagos a concentraciones subinhibitorias (Mühldorfer *et al.*, 1996; Grif *et al.*, 1998; Muniesa *et al.*, 2004a, 2004b).
- Luz UV, radiación o altas presiones hidrostáticas: son potenciales factores activadores del ciclo lítico de los fagos. Y aunque se han propuesto como posibles tratamientos para la eliminación de EHEC en industrias alimentarias (Erickson y Doyle, 2007) la posible activación del ciclo lítico de fagos Stx podría suponer un problema (Yamamoto *et al.*, 2003).

- Inductores eucariotas: algunos productos celulares eucariotas como la hormona epinefrina (Pacheco y Sperandio, 2009), o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wagner *et al.*, 2001a) podrían tener una función inductora del ciclo lítico.
- Otros factores: por ejemplo las colicinas (Toshima *et al.*, 2007) o ciertas señales de *quorum sensing* se ha visto que pueden activar el ciclo lítico. En el caso del *quorum sensing* tendría la función de eliminar a las otras células que compiten por los nutrientes del medio.

Por otro lado, se ha visto que algunos productos metabólicos y algunas cepas probióticas pueden inhibir la producción de fagos (Carey *et al.*, 2008; de Sablet *et al.*, 2009).

Todos estos factores de inducción actúan activando la respuesta SOS, que tiene como última consecuencia la activación del ciclo lítico (Tinsley *et al.*, 2006). Así, estas condiciones provocan un daño en el ADN o la inhibición de la replicación bacteriana, de manera que se activa este sistema de defensa que promueve la supervivencia bacteriana mediante la reparación del ADN (ya sea por recombinación, mutagénesis o la inhibición del crecimiento, entre otros). En esta respuesta SOS (Fig.16) tiene un papel fundamental la proteína RecA (Little *et al.*, 1999), una enzima catalítica clave en la recombinación homóloga, y por eso hablamos de una respuesta RecA-dependiente.

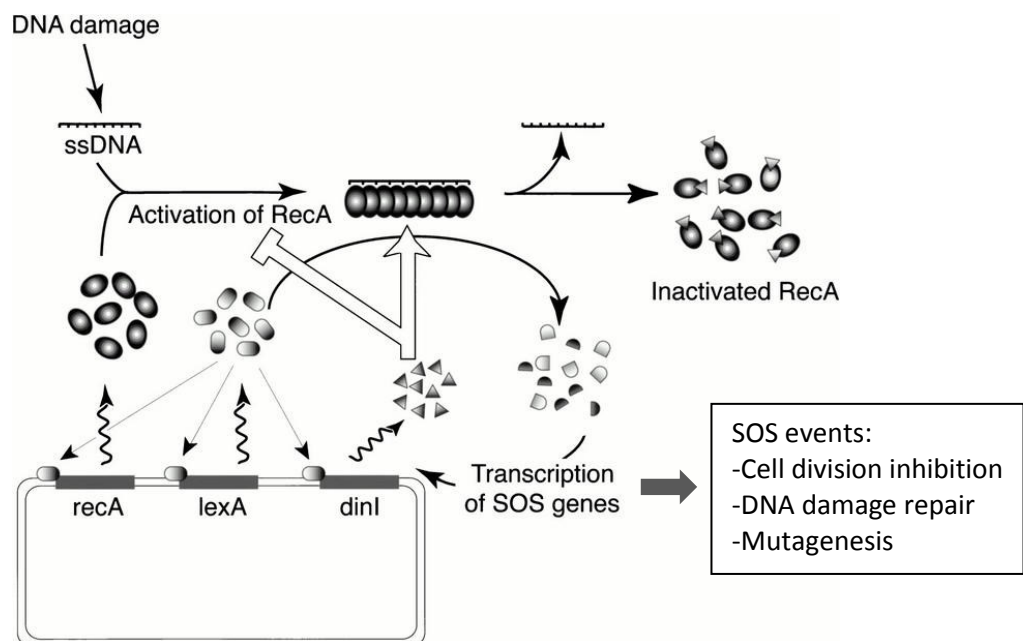


Figura 16. Respuesta SOS, con la participación de la proteína RecA (modificado de Voloshin *et al.*, 2001).

RecA actúa de diferentes maneras. Por una parte controla la reparación del ADN. Además, participa en la recombinación de éste, provocando cambios genéticos que pueden afectar indirectamente en la expresión de genes fágicos, como los factores de virulencia. Pero su papel más importante es el de regular la expresión de proteínas reguladoras fágicas que actúan sobre la expresión de los genes del fago (Fuchs *et al.*, 1999). De esta manera, RecA actúa cortando la proteína represora de la lisis (CI) en la unión alanina-glicina, haciendo que ésta deje de ser funcional y se active el ciclo lítico del fago.

En los últimos años, sin embargo, se ha descrito una inducción independiente de RecA en algunos fagos como  $\lambda$  o Stx (Muniesa *et al.*, 2004; Imamovic y Muniesa, 2012), en cepas *recA*-negativas. Estudios recientes indican que el EDTA o el citrato sódico, ambos agentes quelantes, causan un drástico aumento del número de genomas de fagos Stx en cepas RecA negativas (Imamovic y Muniesa, 2012), pero el mecanismo de inducción RecA-independiente aún no está claro, ni la integridad de las partículas fágicas formadas. El pH alcalino o la presencia en el medio de iones como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Co^{2+}$  podrían también intervenir en la inducción de fagos (Little, 1984).

### **1.10. La “Cytotoxic Distending Toxin” y los fagos Cdt**

El gen *cdt* codifica para la “Cytotoxic Distending Toxin” (Cdt) y fue detectado por primera vez en 1987 en una cepa de *E. coli* O128 aislada a partir de la muestra fecal de un niño menor de 2 años con gastroenteritis (Anderson *et al.*, 1987; Johnson & Lior, 1988). A partir de aquí se empezaron a realizar numerosos estudios para ver la distribución de esta nueva toxina entre las diferentes especies bacterianas y averiguar su estructura genómica y su efecto sobre las células.

En la actualidad, se considera que constituye una familia emergente de toxinas producidas por diferentes patógenos: EHEC, EPEC, STEC, *S. dysenteriae* (Okuda *et al.*, 1995), *Campylobacter* spp. (Johnson y Lior, 1988a; Pickett *et al.*, 1996; Whitehouse *et al.*, 1998), *Salmonella typhi* (Haghjoo y Galan, 2004), *Haemophilus ducreyi* (Cope *et al.*, 1997), *Helicobacter* spp. (Chien *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2000), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Mayer *et al.*, 1999; Boesze-Battaglia *et al.*, 2006), y *Providencia alcalifaciens* (Shima *et al.*, 2012), entre otros.

La proteína Cdt está codificada por un cluster de tres genes adyacentes y solapados, muy homogéneos y conservados entre los diferentes grupos bacterianos:

*cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. Éstos dan lugar a tres polipéptidos, Cdt-A, Cdt-B y Cdt-C con pesos moleculares de 30, 32 y 20 kDa, respectivamente, que se unen y forman la holotoxina (Scott y Kaper, 1994; Pickett *et al.*, 1996), que es de tipo AB<sub>2</sub>. *Salmonella enterica* serovar Typhi es la excepción, puesto que parece no codificar CdtA ni CdtC (Haghjoo y Galán, 2004). Cdt-B constituye la subunidad catalítica con actividad ADNasa I (Elwell y Dreyfus, 2000), mientras que Cdt-A y Cdt-C forman el heterodímero encargado de la translocación de ésta dentro de la célula huésped. El gen *cdtB* es, entonces, el más conservado de los tres genes debido a su función, imprescindible para la acción de la toxina (Pickett *et al.*, 1996).

La toxina Cdt actúa induciendo la formación de células mononucleadas gigantes y bloqueando el ciclo celular eucariota en la transición G2-M (Pérès *et al.*, 1997). De esta manera, inhibe la proliferación celular. El proceso se inicia con la entrada de la toxina dentro de la célula, endocitada vía partículas recubiertas de clatrina (Thelestam y Frisan, 2004), aunque aún se desconoce el receptor o receptores a los que se une. Es transportada a través del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático, y después, gracias a una señal nuclear atípica y a la ayuda de las subunidades Cdt-A y Cdt-C, Cdt-B entra en el núcleo (Fig.17) y actúa como una ADNasa de tipo I, provocando la rotura del ADN de doble cadena (Elwell y Dreyfus, 2000). También actúa fosforilando la histona H2AX de la célula huésped, un marcador que indica la rotura de ADN de doble cadena (Tóth *et al.*, 2009; Shima *et al.*, 2012).

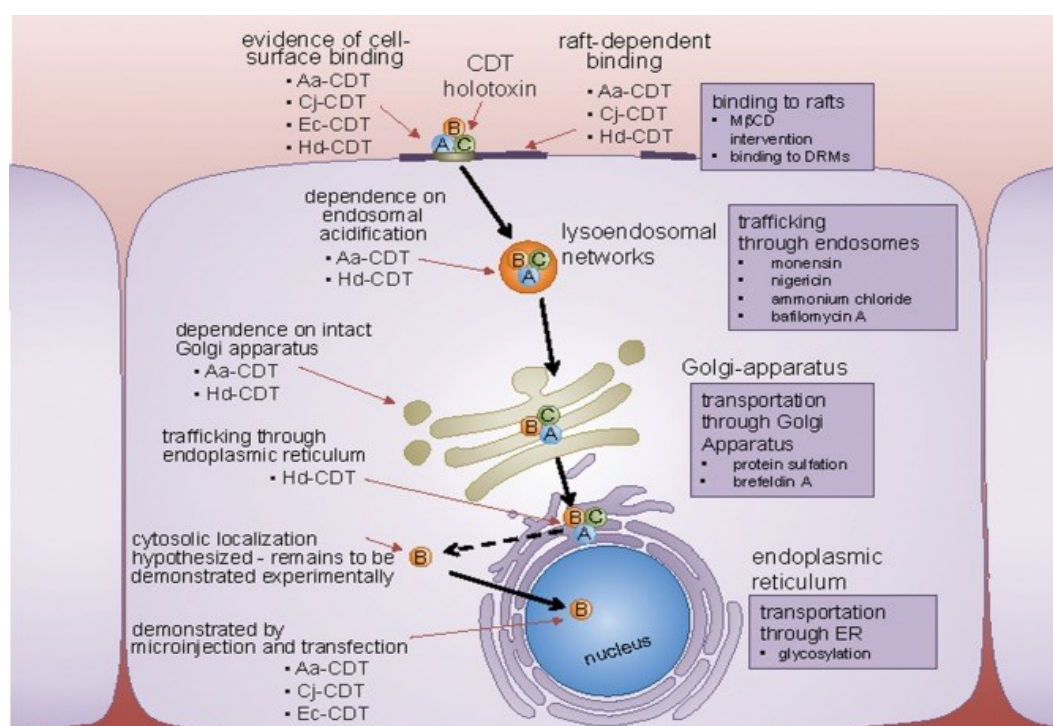


Figura 17. Mecanismo de entrada, transporte, y acción de la toxina Cdt (Gargi *et al.*, 2012).

Como consecuencia, las células dejan de dividirse debido al daño en su ADN, pero continúan creciendo en volumen, de manera que se produce la distensión celular (hasta 5 veces el tamaño original) y finalmente la muerte (Smith y Bayles, 2006), tal y como se ha observado en estudios con células CHO y HeLa (Johnson y Lior, 1987; Orth *et al.*, 2006; Whitehouse *et al.*, 1998; Tóth *et al.*, 2009). De aquí viene el nombre de “*Cytolethal Distending Toxin*”. La Cdt fue la primera toxina bacteriana descrita que bloqueaba el ciclo celular eucariota (Johnson y Lior, 1988) y han sido clasificadas dentro del grupo de las ciclomodulinas.

La manera en que bloquea el ciclo celular eucariota aún se está investigando. Se piensa que actúa sobre la CDK1-cyclin B (“*Cyclin Dependent Kinase 1*”) o MPF (“*M-phase Promoting Factor*”), necesaria para que la célula entre en fase de mitosis. Ésta se encuentra inactiva cuando está fosforilada en el residuo Tyr15 de CDC2 y se activa cuando es desfosforilada por la fosfatasa CDC25 en la fase G2 tardía. De esta manera permite la entrada en la mitosis (Pickett y Whitehouse, 1999). En algunas bacterias, la toxina Cdt también parece inhibir la CDK2-cyclin-E, que bloquearía la transición G1-S (Jinadasa *et al.*, 2011) (Fig.18). Pero aún no se sabe de qué forma interactúa la Cdt con estos componentes para bloquear el ciclo, si lo hace directamente o actúa “*upstream*” sobre las actividades de estas enzimas.

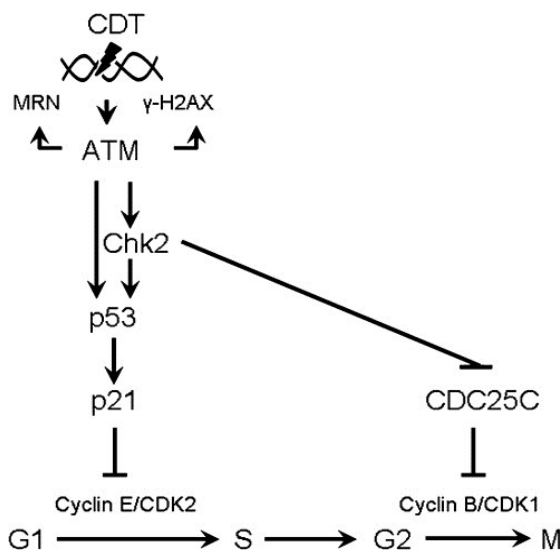


Figura 18. Forma en que la Cdt bloquea la transición a la mitosis, y enzimas implicadas (Jinadasa *et al.*, 2011).

En cuanto al papel de la toxina Cdt en la patogénesis bacteriana *in vivo*, todavía se necesitan muchos más estudios para dilucidar los mecanismos por los cuales esta toxina afecta a la inflamación del tejido o la carcinogénesis (Ge *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha visto que Cdt parece ser necesaria para la colonización persistente del intestino



murino por *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter hepaticus* (Ge *et al.*, 2005), así como para la inducción de la inflamación, aunque todavía se desconocen los mecanismos de actuación y los procesos moleculares implicados.

Hasta el momento se han descrito 5 variantes genéticas de la toxina en *E. coli*, asociadas con diferentes síntomas: *cdt-I*, *cdt-II*, *cdt-III*, *cdt-IV* y *cdt-V* (Pickett *et al.*, 1994; Scott y Kaper, 1994; Pérès *et al.*, 1997; Janka *et al.*, 2003; Tóth *et al.*, 2003). Si se hace una alineación interna de las secuencias de las diferentes variantes, se observa que *cdt-I* y *cdt-IV* son las que presentan mayor similitud entre sí, del 84%. Además, se han realizado estudios que demuestran que estas dos variantes están flanqueadas por genes de profagos lamboides en cepas de *E. coli* patogénicas extraintestinales (Tóth *et al.* 2003). Esto es otra prueba que apoya la hipótesis de que la toxina Cdt puede estar codificada en el genoma de bacteriófagos y es transmitida por éstos en un proceso de transferencia horizontal. Cdt-III, en cambio, se ha visto que está codificada en el plásmido conjugativo pVir, que también codifica factores necrotizantes (Pérès *et al.*, 1997), y Cdt-II en el cromosoma bacteriano.

A diferencia de los fagos Stx, no existen demasiados estudios sobre los fagos Cdt y sus mecanismos de inducción y transducción de la toxina, ni tampoco sobre su presencia y persistencia en el ambiente. La capacidad de los fagos portadores de toxinas de persistir en el medio ambiente define su potencial para lisogenizar y convertir nuevas cepas bacterianas en cepas patógenas productoras de toxinas. Este trabajo de investigación se centrará, principalmente, en el estudio de los fagos Cdt: su caracterización morfológica y genética, su persistencia en el medio ambiente y su capacidad de transducir *cdt*.

### **1.11. Persistencia de los bacteriófagos portadores de genes de virulencia frente a diferentes condiciones ambientales y tratamientos de inactivación**

Los fagos son la forma de vida más numerosa en la Tierra, hasta diez veces más numerosos que las bacterias (Hendrix, 2002; Hanlon, 2007). Se ha estimado que la población global es del orden de  $10^{31}$  partículas víricas. La abundancia de los virus varía significativamente en los diferentes sistemas naturales y está relacionado con la abundancia bacteriana, sugiriendo que la mayoría de virus que se encuentran en el medio son fagos (Weinbauer, 2004). Se encuentran en todo tipo de ambientes donde crecen las bacterias, puesto que son sus huéspedes naturales, y son extremadamente diversos. Así, se han encontrado fagos en ambientes muy diferentes como aguas

profundas y de superficie, en el suelo, en alimentos, en lodos (Tartera y Jofre, 1987; Yoon *et al.*, 2002; Lucena *et al.*, 2006). Incluso se han aislado de diversos tejidos y órganos en humanos y animales (Keller y Traub, 1974; Bachrach *et al.*, 2003), y forman parte también de la flora intestinal en mamíferos (Kameyama *et al.*, 2001).

En los ecosistemas acuáticos son especialmente abundantes, con valores de más de  $10^7$  partículas víricas/ml de agua (Wommack y Colwell, 2000), donde son responsables de entre 10-80% de la mortalidad bacteriana, adquiriendo así un papel importante como factor limitante de estas poblaciones (Weinbauer, 2004). De esta manera, los fagos pueden regular las poblaciones bacterianas, y afectar también a su diversidad, por ejemplo, eliminando y desplazando especies bacterianas que compiten por un determinado nicho ecológico. Esta mortalidad y la liberación de productos celulares al medio ambiente pueden, además, influenciar los procesos metabólicos del resto de la población así como los ciclos biogeoquímicos (Weinbauer, 2004).

Además, también pueden actuar como vectores de transmisión de diferentes genes, tal y como se ha comentado anteriormente. Este proceso de transferencia horizontal podría provocar la aparición de nuevas cepas mejor adaptadas, que podrían desplazar a la anterior población.

Además de ser muy abundantes en sistemas acuáticos, también se han encontrado fagos en ambientes con condiciones extremas, como pueden ser el desierto del Sahara, aguas del Mar del Norte, aguas termales, o ambientes muy ácidos (Wichels *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2003; Breitbart *et al.*, 2004; Prigent *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2010). Esto sugiere que los fagos han ido evolucionando para adaptarse a determinadas condiciones ambientales, manteniendo en su genoma aquellos genes relevantes que confieren ventajas evolutivas y una mejor adaptación al medio. Su existencia en todos estos ambientes indica, por tanto, que los bacteriófagos han evolucionado para sobrevivir en una gran variedad de nichos ecológicos.

De esta manera, diversos factores ambientales pueden afectar a la supervivencia de los fagos, que pueden ser inactivados debido a daños en su estructura, la pérdida de lípidos o daños en el ADN. La temperatura es un factor clave (Yates *et al.*, 1985; Nasser y Oman, 1999; Olson *et al.*, 2004), puesto que juega un papel fundamental en la adsorción, la penetración, la multiplicación y la duración del período de activación del ciclo lítico en el caso de fagos atemperados (Jończyk *et al.*, 2011). Por ejemplo, en algunos fagos el tiempo de inducción se ve incrementado a altas temperaturas (Tey *et al.*, 2009). Además, la temperatura determina la actividad, viabilidad y estabilidad de los fagos. Aun así, se

han encontrado bacteriófagos capaces de sobrevivir en ambientes con elevadas temperaturas como las aguas termales (entre 40-90°C) (Breitbart *et al.*, 2004), y fagos muy resistentes a los tratamientos termales, como los fagos que infectan a *Lactococcus spp.* (Buzrul *et al.*, 2007; Atamer *et al.*, 2008). Además, algunos autores defienden que los puentes disulfuro de la cápside de algunos fagos podrían proteger de la inactivación por calor (Caldeira y Peabody, 2007).

La temperatura también es muy importante a la hora de almacenar suspensiones de bacteriófagos. El almacenamiento a largo plazo no es muy recomendable a T<sup>a</sup> ambiente (Mullan, 2001), así como tampoco a -20°C sin añadir glicerol, ya que la formación de cristales de hielo podría inactivarlos (Warren y Hatch, 1969). Lo óptimo sería almacenarlos a -80°C. En cuanto al almacenamiento a corto plazo (menos de 40 días), se recomienda 4°C (Olson *et al.*, 2004), aunque no para fagos de alto contenido lipídico. Aún así, no existe un método universal de almacenamiento de las suspensiones fágicas, puesto que depende de cada tipo de fago (Golec *et al.*, 2011).

Otro factor limitante para la supervivencia de los fagos es el pH del medio. Generalmente, los fagos sobreviven mejor en ambientes con pH neutro (entre 6 y 8) (Kerby *et al.*, 1949; Klak *et al.*, 2010), aunque se han encontrado fagos capaces de persistir en ambientes ácidos con pH<3.5 (Lu *et al.*, 2003) o fagos que toleran ambientes más alcalinos, como algunos T7. Algunos autores sostienen que cambios en el pH del medio podrían proteger a los fagos de las bajas temperaturas (Thorne y Holt, 1974). Por tanto, parece que existiría una relación entre temperatura y pH en cuanto a la supervivencia de los fagos.

La salinidad y la concentración de iones también son factores decisivos en la actividad de los bacteriófagos. Por ejemplo, un cambio brusco de la presión osmótica del medio puede causar la rotura de las cápsides (Lark y Adams, 1953). La presencia de fagos en agua marina de diferente salinidad (Wichels *et al.*, 1998) es otro ejemplo de la evidente adaptación al medio de estos organismos. También la composición química del agua y la presencia de iones puede influenciar en la estabilidad de los fagos. Así, se ha sugerido que determinados iones y metales divalentes podrían suponer cierta protección contra la inactivación (Adams, 1949; Whang *et al.*, 1996). La presencia de cationes es necesaria para la adsorción del fago a su receptor, y se incluye la adición de cationes (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) en la mayoría de métodos empleados para enumerar fagos que infectan a una bacteria huésped.

Además de estos factores, existen muchos otros como la radiación solar, la humedad o la presencia de protozoos que condicionan la supervivencia de los fagos en los diferentes ambientes. La variación de uno de éstos puede suponer un cambio en la sensibilidad del fago a otro de los factores (Müller-Merbach *et al.*, 2004). Por tanto, se puede decir que la inactivación de los fagos en el medio ambiente es multifactorial y que depende de la combinación de los muchos factores que pueden estar presentes en un determinado ambiente

Los bacteriófagos constituyen un grupo muy heterogéneo, con diversas morfologías fágicas y elevada variabilidad en cuanto a estructura, tamaño, composición y ácidos nucleicos (Ackermann, 2007). El 96% tienen cola, aunque también hay algunos sin cola, pleomórficos o filamentosos (Hendrix, 2002). En general y, según los numerosos estudios realizados, parece que los fagos con cola y cápside grande serían los más estables bajo condiciones adversas como la desecación o fluctuaciones de temperatura. Algunos autores sugieren que las morfologías *Myoviridae* y *Siphoviridae* son dos de las más resistentes (Prigent *et al.*, 2005) y por tanto las más abundantes. De esta manera, parece existir una relación entre estructura fágica y supervivencia (Lasobras *et al.*, 1997; Muniesa *et al.*, 1999b; Lin *et al.*, 2010). Aún así, se ha visto que fagos de la misma familia pueden tener persistencias muy diferentes y que fagos que viven en ambientes similares pueden tener morfologías diferentes (Bettstetter *et al.*, 2003).

En la actualidad, muchos de los patógenos transmitidos a través del agua son virus entéricos. El hecho de que los virus sean más persistentes que las bacterias ha hecho que los clásicos indicadores bacterianos para determinar la calidad del agua y la contaminación fecal (coliformes totales, coliformes fecales, enterococos y *E. coli*) no sean adecuados para determinar la presencia de este tipo de microorganismos. Por ello, hace años que surgió la necesidad de encontrar indicadores de tipo vírico, con comportamiento parecido al patógeno y con una persistencia similar o superior a éste (Durán *et al.*, 2002). Por eso, se propusieron los bacteriófagos como potenciales indicadores modelo, concretamente los colifagos somáticos, los fagos F-ARN específicos y los fagos que infectan a *Bacteroides fragilis* (Tartera y Jofre, 1987).

En relación a esto, en los últimos años se han realizado numerosos estudios para determinar la estabilidad de los fagos tras diferentes tratamientos de inactivación comúnmente utilizados para la eliminación de microorganismos en aguas, lodos o alimentos: luz UV (Lee y Sobsey, 2011), cloración (Dee y Fogleman, 1992; Durán *et al.*, 2003), altas presiones hidrostáticas, tratamiento térmico (Mocé-Llivina *et al.*, 2003),

desinfectantes (Wigginton *et al.*, 2012), inactivación natural (Durán *et al.*, 2002; Mauro *et al.*, 2013), o la combinación de varios de estos tratamientos.

Los resultados indican que los diferentes fagos presentan diferentes respuestas al mismo tratamiento, indicando así la enorme variabilidad de éstos en cuanto a estabilidad. Los resultados de estos estudios también indican que la persistencia de los fagos a los diferentes factores de inactivación es siempre superior a la de las células bacterianas a las que infectan. En general, si comparamos el orden de supervivencia (de menor a mayor) de los indicadores bacterianos y fágicos, sería: coliformes fecales y *E. coli*, enterococos, fagos F-ARN específicos, enterovirus y por último colifagos somáticos, junto con fagos que infectan a *B. fragilis* y las esporas de clostridios sulfito-reductores, que serían los más persistentes (Mocé-Llivina *et al.*, 2003). Dentro del grupo de los colifagos somáticos, de nuevo las morfologías *Myoviridae* y *Siphoviridae* serían las más resistentes (Lee y Sobsey, 2011; Muniesa *et al.*, 1999b).

Por tanto, aunque los tratamientos aplicados a aguas y alimentos sean efectivos contra bacterias patógenas, como STEC, algunos fagos son capaces de sobrevivir y permanecer activos ante estos mismos tratamientos. De esta manera, si contienen algún gen de virulencia, como la Stx o la Cdt, podrían transducirla a una cepa bacteriana negativa y potenciar la aparición de nuevas cepas virulentas, cosa que supondría un peligro para la salud humana.

Aunque existe información previa sobre la prevalencia ambiental, características morfológicas y genéticas y mecanismos de inducción de fagos Stx, los estudios sobre su persistencia ambiental son escasos. Por el contrario, en el caso de los fagos Cdt, no hay apenas información sobre sus mecanismos de inducción, capacidad de transducción, prevalencia y persistencia medioambiental. Para generar esta información nos planteamos los objetivos de esta tesis doctoral.



## **2. OBJETIVOS**





- I. Determinar la presencia del gen *cdt* en muestras ambientales y estudiar su transducción (publicación 1):
  - Determinar la presencia de *cdt* en una colección de cepas STEC ambientales y relacionarla con la presencia de otros factores de virulencia.
  - Establecer el mecanismo de transferencia horizontal del gen entre diferentes cepas: bacteriófagos portadores de la toxina Cdt.
  
- II. Caracterización de los fagos Cdt (publicación 1):
  - Aislar y purificar fagos Cdt a partir de muestras ambientales.
  - Determinar a qué variante pertenecen: Cdt-I a Cdt-V.
  - Cuantificación del título fágico y del número de copias de genoma (diseño de una qPCR específica para Cdt).
  - Estudiar la inducción del ciclo lítico de los fagos con diferentes agentes inductores: mitomicina C, EDTA y ciprofloxacina.
  - Estudiar la capacidad de los fagos Cdt de transducir el gen *cdt* a otras cepas y formación de lisógenos.
  - Caracterización morfológica.
  - Estudiar las secuencias adyacentes al gen *cdt*.
  
- III. Estudiar la persistencia de los fagos Cdt (publicación 2):
  - Estabilidad de los fagos bajo diferentes condiciones ambientales: temperatura y pH.
  - Supervivencia de estos fagos tras diferentes tratamientos de inactivación: cloración, luz UV, tratamiento térmico e inactivación natural.
  
- IV. Persistencia de fagos Stx (publicación 3):
  - Comparar la persistencia de dos fagos Stx de morfología *Podoviridae* bajo las mismas condiciones y tratamientos aplicados a los fagos Cdt.
  - Determinar la capacidad de transducción de genes *stx* tras los tratamientos de inactivación.
  
- V. Secuenciación completa de un fago Cdt-V (publicación 4):
  - Evaluar la inducción y capacidad de transducción de un fago Cdt-V.

- Determinar la organización genética de un fago Cdt-V y establecer dónde se localizan los genes *cdt*.
- Estudiar la auto-inducción de los fagos Cdt-V a partir de la información obtenida de la secuenciación de su genoma.

### **3. RESULTADOS**



### **3.1. El bacteriófago Cdt-V inducido a partir de cepas de *Escherichia coli* no clínicas**



## El bacteriófago portador del gen de la “Cytolethal Distending Toxin” de tipo V inducido a partir de cepas de *Escherichia coli* no clínicas

**Anna Allué-Guardia**, Cristina García-Aljaro y Maite Muniesa\*

\*Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Diagonal 645, Anexo, Planta 0, 08028 Barcelona, España

### Introducción

La toxina Cdt (“Cytolethal Distending Toxin”) fue descrita por primera vez en 1987 como una nueva toxina producida por *Escherichia coli* (Johnson y Lior, 1987). Es una toxina de tipo AB<sub>2</sub> que bloquea el ciclo celular eucariota en las fases G2/M de la mitosis, cosa que provoca una distensión celular de hasta 5 veces el tamaño normal, y finalmente se produce la apoptosis (Whitehouse *et al.*, Ohara *et al.*, 2004).

En la actualidad, la Cdt ha sido descrita en un gran número de bacterias Gram negativas y está codificada por tres genes adyacentes (*cdtA*, *cdtB* y *cdtC*), que muestran diferentes grados de similitud entre géneros, siendo CdtB la subunidad catalítica. En *E. coli* han sido descritas 5 variantes, localizadas en el cromosoma (Cdt-II), en el plásmido pVir (Cdt-III) o rodeadas de secuencias homólogas a genes de fagos de tipo lambda o P2 (Cdt-I, Cdt-IV y Cdt-V) (Asakura *et al.*, 2007).

La información existente sobre cepas productoras de toxina Cdt pertenece a aislamientos clínicos. Sin embargo, el intercambio genético en el medio ambiente también podría conducir a la aparición de nuevas cepas patógenas (Cangelosi *et al.*, 2004; Canton, 2009). Este intercambio se produce, principalmente, por elementos genéticos de transferencia horizontal, siendo los bacteriófagos un posible vehículo en este proceso de transducción (Waldor *et al.*, 2001). Estudios anteriores sugieren que algunas variantes de Cdt (Cdt-I y Cdt-IV) fueron adquiridas a partir de un ancestro común por transducción fágica y evolucionaron en sus huéspedes (Tóth *et al.*, 2009).

### Objetivos

Así pues, los objetivos de este estudio son: determinar la prevalencia de *cdt* en cepas STEC (“Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*”) de origen no clínico y compararlo con la incidencia en cepas no STEC, así como dilucidar si los fagos pueden actuar como reservorio y vehículos de transferencia de este gen a cepas negativas para *cdt*. También

se observará el efecto de distensión celular de la toxina sobre células HeLa y se estudiarán las secuencias adyacentes al gen *cdt*. Por último, se evaluarán los niveles de inducción del fago mediante PCR cuantitativa y se observará su morfología por microscopía electrónica.

## Resultados

Para detectar la presencia del gen *cdt* y todas sus variantes se usó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex que contenía 2 parejas de cebadores para la detección de las diferentes variantes (Tóth *et al.*, 2003). Se aplicó esta PCR en una colección de 140 cepas de *E. coli* ambientales portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>, que fueron aisladas de diferentes muestras de agua con contaminación fecal humana y animal (aislamiento de las cepas: Dra. C. García-Aljaro; García-Aljaro, 2004). Un 12.1% de las muestras resultaron positivas, y fueron confirmadas mediante hibridación colonial con una sonda *cdtB* específica marcada con digoxigenina. Se usaron cebadores específicos para determinar a qué variante correspondía cada muestra. Entre el 88-90% de las cepas resultó ser *cdt-V*, mientras que las variantes *cdt-I* y *cdt-III* se encontraron en un porcentaje del 5% cada una.

Se verificó si los genes de la toxina podían estar codificados en el genoma de virus bacterianos o bacteriófagos. Para ello, se realizó la inducción de los cultivos de las cepas *cdt* positivas con mitomicina C. La inducción de ciclo lítico del fago se traduce en una reducción de la densidad óptica (DO) del cultivo. Se observó una reducción en los valores de DO a 600 nm a las 6 horas post inducción, lo que implicaba la activación del ciclo lítico de los fagos atemperados presentes en las cepas, entre ellos el fago Cdt.

Se quiso verificar si los fagos Cdt inducidos de las cepas eran infectivos. Para ello, se utilizó una suspensión de fagos inducidos de las cepas y se realizó el test de la gota sobre diferentes cepas huésped de laboratorio (*E. coli* C600, *E. coli* DH5α y *Shigella sonnei* 866). Las calvas de lisis obtenidas en la zona de la gota fueron examinadas por hibridación de calva de lisis ("plaque blot") (Sambrook y Russell, 2001) con una sonda *cdtB* marcada con digoxigenina. Se confirmó que se trataba de fagos Cdt infectivos en 5 de las cepas positivas para *cdt*.

Se quiso ver si alguno de estos 5 fagos eran capaces de transducir el gen de la toxina Cdt a cepas bacterianas *cdt* negativas. Tras diversos intentos, se consiguieron dos lisógenos Cdt-V, S(Φ62) y S(Φ125), usando *S. sonnei* como cepa huésped. Los lisógenos, tras una inducción con mitomicina C, también fueron capaces de producir



fagos Cdt infectivos. No se consiguieron lisógenos ni sobre *E. coli* C600 ni sobre *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Se realizó la caracterización morfológica de los fagos inducidos a partir de los dos lisógenos. En los dos lisados fágicos se observaron fagos de tipo *Siphoviridae*, correspondientes a los fagos Cdt. Pero en la muestra S( $\Phi$ 62) se observó una segunda morfología correspondiente al grupo *Podoviridae*, que se encontraba en una proporción mucho menor. Se concluyó que se trataba del fago Stx<sub>2</sub>, y que S( $\Phi$ 62) era un doble lisógeno, puesto que en el proceso se debieron transducir los dos fagos, Cdt y Stx (recordemos que la cepa original de la que se obtuvieron los lisógenos era positiva para el gen *stx*<sub>2</sub>, simultáneamente). Al estudiar la inducción de los dos lisógenos, vimos que la DO disminuía en las cepas originales (62 y 125) y en el lisógeno S( $\Phi$ 62), mientras que se mantenía constante en S( $\Phi$ 125). Esta disminución, tal como se verificó mediante qPCR específica para *stx*<sub>2</sub> y *cdt-V*, se debe a la inducción del fago Stx, mientras que el fago Cdt, aparentemente, es de inducción espontánea, ya que el lisógeno que únicamente contiene el fago Cdt no presenta variación en la DO del cultivo tras la inducción del ciclo lítico del fago en comparación con la cepa sin inducir.

Para la caracterización parcial del fago Cdt  $\Phi$ 125 y de las secuencias adyacentes a *cdt* se usó el lisógeno S( $\Phi$ 125), que no contenía el fago Stx<sub>2</sub>. Se hizo una restricción con *Cla*I y *Eco*RI del ADN del fago Cdt inducido, y tras electroforesis en gel de agarosa, se transfirió e hibridó mediante Southern Blot. Los resultados mostraron una banda de 3211 pb que contenía el gen *cdt*. Ésta se purificó a partir del gel de agarosa y se clonó en el vector pBC-SK. El fragmento clonado se analizó por secuenciación. El gen *cdt* del fragmento mostró una homología del 100% con los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, y también se encontró en la región “*downstream*” adyacente a *cdtC* un ORF truncado que presentaba una elevada homología con la proteína A del fago P2.

Se verificó si el gen Cdt transducido a la cepa huésped permitía la expresión de toxina Cdt activa. Mediante técnicas de cultivo celular sobre células HeLa, se pudo observar el efecto de distensión celular provocado por la toxina Cdt del lisado fágico de S( $\Phi$ 125). No se pudo observar este efecto en el caso de S( $\Phi$ 62), puesto que el efecto citotóxico de la toxina Shiga enmascaraba el de la Cdt.

Por último, se realizó un estudio de la prevalencia de fagos Cdt en muestras ambientales no clínicas. Para ello se cuantificó el número de copias del gen *cdt* en el ADN fágico obtenido a partir de muestras de agua residual urbana y también a partir de muestras de agua con contaminación fecal animal. Se obtuvieron un 62.5% de muestras

positivas en el primer caso y de 73.3% en el segundo caso, con densidades de hasta  $10^3$  CG/100ml. Estos valores nos indican que hay fagos Cdt circulando libres en el medio ambiente.

### Discusión

Se observó que la incidencia de *cdt* en cepas ambientales es muy similar a la descrita en cepas de origen clínico (Bielazewska *et al.*, 2004; Bielazewska *et al.*, 2009), demostrando que las cepas STEC productoras de Cdt se encuentran en el medio ambiente. De entre todas las variantes, se observó mayor prevalencia de la variante *cdt-V*. Algunos autores sugieren que aquellos serotipos de *E. coli* que no tienen los principales factores de virulencia (*stx*, *eae*, etc) contienen *cdt*. Se propone, por tanto, que la Cdt podría contribuir a la patogenicidad de las cepas de *E. coli* que carecen de otros factores de virulencia (Friedrich *et al.*, 2006). Su relativamente amplia distribución se observa en la prevalencia del gen en la colección de cepas ambientales.

En este estudio se demostró que *cdt-V* puede encontrarse en un fago y que éste puede transducir el gen de la toxina a otras cepas. Se obtuvieron dos lisógenos en una cepa de *S. sonnei*. Esta cepa ya había mostrado buenas habilidades como cepa huésped de fagos Stx en estudios previos de nuestro grupo (Serra-Moreno *et al.*, 2007). A partir de los lisógenos, se comprobó que el fago Cdt-V presenta inducción espontánea, puesto que los niveles de inducción no se ven afectados por los agentes inductores, de acuerdo con los valores de DO y qPCR. Esto contrasta con estudios anteriores realizados con el fago Cdt-I, que requiere mitomicina C para activar su ciclo lítico (Asakura *et al.*, 2007).

Estudios anteriores han demostrado la doble y la triple lisogenia del fago Stx como un mecanismo para incrementar la variabilidad genética entre cepas (Serra-Moreno *et al.*, 2008). En este caso se demostró la lisogenización simultánea de una cepa huésped con un fago Cdt y con un fago Stx. Esta lisogenización ocurrió sin ningún tipo de selección, apoyando la teoría de que la lisogenia múltiple es común en *E. coli* patogénicas por incorporación de diversos fagos portadores de genes de virulencia en algún punto de su evolución.

Referente a la caracterización del fago Cdt-V  $\Phi$ 125, se vió que se trata de un fago de tipo *Siphoviridae*, similar a un fago Cdt-I descrito anteriormente (Asakura *et al.*, 2007). La región adyacente al operón *cdt-V* presentó homología con un fragmento del gen *gpA* de los fagos de tipo P2. Esta homología con P2 en regiones adyacentes a *cdt-V* ya se había descrito en estudios anteriores (Friedrich *et al.*, 2006; Tóth *et al.*, 2009), a

diferencia de las variantes del gen *cdt-I* y *cdt-IV*, que no están relacionados con genes de fagos P2. También se vió que los lugares de inserción de los fagos Cdt-V en el genoma bacteriano no coinciden con los descritos para Cdt-I (Asakura *et al.*, 2007). Esta variabilidad entre fagos no es sorprendente, puesto que se sabe de su capacidad de intercambiar fragmentos de diferentes orígenes.

La presencia de *cdt* en la fracción fágica de muestras ambientales indica la presencia de estos fagos en el medio ambiente, donde podrían actuar como reservorios de este gen. Además, la inducción espontánea permitiría la liberación continua de partículas fágicas al medio ambiente, donde podrían transducir el gen de la toxina a cepas negativas para *cdt*, convirtiéndolas así en cepas más virulentas.

#### Informe del factor de impacto

El artículo titulado “**Bacteriophage-Encoding Cytolethal Distending Toxin Type V Gene Induced from Nonclinical *Escherichia coli* Isolates**” fue publicado en agosto de 2011 en la revista *Infection and Immunity* 79(8):3262-3272, que tuvo un factor de impacto de 4,165 para el año 2011 y que pertenece al primer cuartil de las categorías Immunología y Enfermedades Infecciosas.

#### Informe de coautoría

La Dra. Cristina García Aljaro aisló y proporcionó la colección de cepas de *E. coli* ambientales utilizadas en el estudio. La doctoranda realizó los procedimientos experimentales (PCR, diseño de una qPCR específica de Cdt-V, ensayos de inducción, caracterización morfológica y genética, ensayos de cultivo celular) y participó en la redacción del artículo.



## Bacteriophage-Encoding Cytolethal Distending Toxin Type V Gene Induced from Nonclinical *Escherichia coli* Isolates<sup>∇</sup>

Anna Allué-Guardia, Cristina García-Aljaro, and Maite Muniesa\*

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

Received 15 March 2011/Returned for modification 13 April 2011/Accepted 26 May 2011

Cytolethal distending toxin (Cdt) is produced by a variety of pathogenic bacteria, including pathogenic serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). The Cdt family comprises five variants (Cdt-I to Cdt-V) encoded by three genes located within the chromosome or plasmids or, in the case of Cdt-I, within bacteriophages. In this study, we evaluated the occurrence of the *cdt* gene in a collection of 140 environmental STEC isolates. *cdt* was detected in 12.1% of strains, of which five strains carried inducible bacteriophages containing the Cdt-V variant. Two Cdt-V phages of the *Siphoviridae* morphology lysogenized *Shigella sonnei*, generating two lysogens: a single Cdt phage lysogen and a double lysogen, containing a Cdt phage and an Stx phage, both from the wild-type strain. The rates of induction of Cdt phages were evaluated by quantitative PCR, and spontaneous induction of Cdt-V phage was observed, whereas induction of Stx phage in the double lysogen was mitomycin C dependent. The Cdt distending effect was observed in HeLa cells inoculated with the supernatant of the Cdt-V phage lysogen. A *Cla*I fragment containing the *cdt-V* gene of one phage was cloned, and sequencing confirmed the presence of Cdt-V, as well as a fragment downstream from the *cdt* homolog to *gpA*, encoding a replication protein of bacteriophage P2. Evaluation of Cdt-V phages in nonclinical water samples showed densities of 10<sup>2</sup> to 10<sup>9</sup> gene copies in 100 ml, suggesting the high prevalence of Cdt phages in nonclinical environments.

Cytolethal distending toxin (Cdt) was first described in 1987 (21) as a new toxin produced by *Escherichia coli* strains. Bacterial Cdts belong to the AB<sub>2</sub>-type of toxins that block the G<sub>2</sub> and early M phases during mitosis (30, 42). Consequently, the cells do not divide, but since they continue to grow, distension to five times their normal size can be observed before their disintegration. Cdt is a virulence factor that benefits bacterial survival and enhances microbial pathogenicity (31). Current experimental evidence supports the important role of Cdts in the *in vivo* pathogenesis of Cdt-producing bacteria, which can induce hepatocellular carcinoma and inflammation of the stomach, intestine, and liver in susceptible mouse strains during chronic infection (15).

Multiple pathogenic Gram-negative bacteria have been found to produce Cdt, including *E. coli* (which produces five distinct variants of Cdt), *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Aggregatibacter* (formerly *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter* spp., and *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) (17, 31, 38). Cdt is encoded by three adjacent genes (*cdtA*, *cdtB*, and *cdtC*), which express three subunits: CdtA, CdtB, and CdtC. The catalytic subunit CdtB has DNase I-like activity, whereas CdtA and CdtC are binding proteins that deliver CdtB into target cells, with cytotoxic effects (5, 15). All three *cdt* genes must be expressed for Cdt to initiate cellular toxicity, and all are found in these species, with the exception of *S. Typhi*, which only contains CdtB (36), although the role of CdtB in *Salmonella* pathogenesis is unclear (17). The Cdt subunits of a given genus

show various degrees of similarity to the Cdt proteins of other genera.

The *cdt* clusters are generally located on the chromosome of Cdt-producing bacteria. However, the five variants of Cdt produced by *E. coli* are an exception since within this genus, Cdts can be encoded by chromosomal genes (EcCdt-II) or chromosomal genes flanked by bacteriophage P2 and lambda-like sequences (EcCdt-V), lambdoid prophage genes (Cdt-IV), and also by inducible lambdoid prophages (Cdt-I) (1) or a pVir plasmid (Cdt-III) (36).

Current information about Cdt-producing strains pertains to clinical isolates. Nevertheless, outside the clinical setting, gene exchange can lead to the emergence of new pathogenic strains, which can subsequently be found in hospitals (7, 8). This exchange is mostly conducted by elements of horizontal gene transfer, that is, genomic islands, plasmids, bacteriophages, and transposons. In recent decades, bacteriophages have increasingly been recognized as elements of horizontal gene transfer (6, 26, 41), especially since studies on microbial genomics have shown that a significant proportion of bacterial DNA corresponds to phage DNA (6). With regard to Cdt, the presence of the *cdt* genes within mobile genetic elements has been described previously (1, 40), and the data suggest that the *cdt-I* and *cdt-IV* genes might have been acquired from a common ancestor by phage transduction and then evolved in their bacterial hosts. In all cases, *cdt* genes are located downstream of the prophage head and tail genomic regions. *cdtC* is located upstream from a P4-like prophage integrase gene (*intB*) (40), and a protease gene is located downstream of *cdt-IV* genes.

There is a clear relationship between Cdt production and pathogenic serotypes of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) of clinical origin, including O157 (12) and non-O157 serotypes (3, 4). Although information is available about the occurrence

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 645, Annex, Floor 0, 08028 Barcelona, Spain. Phone: 34 3 4039386. Fax: 34 3 4039047. E-mail: mmuniesa@ub.edu.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 6 June 2011.

TABLE 1. Oligonucleotides used in this study

PCR	Primer	Sequence	Size (bp)	Source or reference
Multiplex CDT	CDT-up1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCGG	466	39
	CDT-up2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCGG		
	CDT-lp1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA		
	CDT-lp2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA		
qPCR CDT	qcdtB-F	AGGCCGATGAAAGTGTGTTCTT	69	This study
	qcdtB-R	CAATCCGTATGCCAAGCAATGG		
	qcdt-probe	6FAM-CCGCCACCTTGCCCTT-MGBNFQ		
CDT-I	CdtI-up	CAATAGTCGCCCACAGGA	411	39
	CdtI-lp	ATAATCAAGAACACCACCAC		
CDT-II	CdtII-up	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCGG	556	
	CdtII-lp	TTTGTGTTGCCGCCGCTGGTAAA		
CDT-III	CdtIII-f	AAACAGGACGGTAATAATGACTAATA	2,230	9
	CdtIII-r	GTGATCTCCTTCCATGAAAATATAGT		
CDT-IV	CdtIV-up	CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC	350	39
	CdtIV-lp	TTGCTCCAGAATCTATACCT		
CDT-VA	c338f	AGCATTAATAAAAAGCACGA	1,329	19
	c2135r	TACTTGCTGTGGTCTGCTAT		
CDT-VB	c1309f	AGCACCCGAGTATCTTTGA	1,363	19
	c2166r	AGCCTCTTTTATCGTCTGGA		
CDT-VC	P105	GTCAACGAACATTAGATTAT	748	19
	c2767r	ATGGTCATGCTTTGTTATAT		
STX	S2Aup	ATGAAGTGTATATTATTTA	960	28
	S2Alp	TTCTTCATGCTTAACTCCT		
	UP378	GCGTTTTGACCATCTTCGT	378	27
	LP378	ACAGGAGCAGTTTCAGACAG		
qPCR STX	STX-Any F	ACGGACAGCAGTTATAACCCTCT	65	18
	STX-Any R	CTGATTTGCATTCCGGAACGT		
	STX-Any M	FAM-CCAGCGCTGCGACACG-NFO		
Sequencing of the CDT fragment	pBC-SK T7	TAATACGACTCACTATAGGGC		Agilent Technologies
	pBC-SK SK	CGCTCTAGAACTAGTGGATC		Agilent Technologies
	WP-cdtA	GTCTCCCTCTACTTGA		This study
	WP-cdtC	GTGGATAATGATTGCGAA		This study
	WP P22	ATTTGCGTAGTTACCGGT		This study
CDT-1Φ integration site	P1	CCATTACTCACCTTGTAC	1,108	1
	P2	TGCTCTGAAAGTGACCG		1
	B1	GAGTCCGATATTCTCGG	1,305	1
	B2	TTCTTCAACGTGCGAACG		1

of other virulence factors, such as STEC and Stx phages, in nonclinical settings (13, 14, 18), the same kind of study has not been reported for *cdt*. The present study was conducted (i) to determine the prevalence of *cdt* in STEC strains of nonclinical origin, (ii) to compare this incidence with non-STEC strains of nonclinical origin, and (iii) to elucidate whether bacteriophages, as free phages or associated with *E. coli*, could act as a reservoir and vehicle of transmission of *cdt* genes.

MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, serotyping, bacteriophages, and media.** Cdt was evaluated in a collection of 140 *stx*<sub>2</sub>-positive *E. coli* strains available in our laboratory. These strains were isolated from fecally polluted environments (domestic sewage, cattle, pigs, and poultry wastewater) according to previously described methods (13). Serotyping of O and H antigens was carried out according to the method described by Guinée et al. (16), using all available O (O1 to O181) and H (H1 to H56) antisera. All antisera were obtained and absorbed with the corresponding cross-reacting antigens to remove nonspecific agglutinins. The O antisera were produced in the Laboratory Reference for *Escherichia coli*, and the H antisera were obtained from the Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark). The collection comprised 11 O157:H7 strains, 1 O157:H- strain, and 128 strains of other serotypes.

*E. coli* laboratory strain DH5α, *E. coli* strain C600, and a *Shigella sonnei* clinical isolate 866 were used as host strains in the experiments described below and for propagation of the bacteriophages induced from the strains studied. Luria-Bertani (LB) broth or LB agar was used to culture the bacteria. When

necessary, media were supplemented with ampicillin at 100 μg/ml or chloramphenicol at 25 μg/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

**Standard DNA techniques.** Chromosomal DNA was prepared from 40-ml cultures as previously described (28). Chromosomal DNA was digested with XmnI restriction endonuclease (Promega, Madison, WI). This endonuclease does not cut *cdt*. Phage DNA was digested with ClaI and EcoRV restriction endonucleases (Promega). Restriction fragments were separated on 0.8% agarose gels in Tris-borate-EDTA buffer and stained with ethidium bromide. PCR products were purified using a PCR purification kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

**PCR studies.** PCRs were performed with a GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer/PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain) with the oligonucleotides listed in Table 1. Screening for *cdt* in the isolates was performed by using multiplex CDT PCR (Table 1), and the different variants were later analyzed with the specific oligonucleotides. Similarly, the presence of *stx*<sub>2</sub> was confirmed using the primers UP378/LP378 and S2Aup/lp, and the variants were confirmed by sequencing. Purified bacterial or phage DNA was diluted 1:20 in double-distilled water. The PCR product was analyzed by gel electrophoresis, and bands were visualized by ethidium bromide staining. When necessary, PCR products were purified by using a PCR purification kit (Qiagen).

**Real-time qPCR. (i) Preparation of standard curves.** A plasmid construct was used to generate standards for the quantitative PCR (qPCR) assays. The 466-bp fragment of *cdtB* obtained by conventional PCR (Table 1) and purified as described above was cloned by using a pGEM-T Easy vector, into which the PCR products were inserted, according to the manufacturer's instructions (Promega, Barcelona, Spain). The construct was transformed by electroporation into *E. coli* DH5α electrocompetent cells. Cells were electroporated at 2.5 kV, 25-F capacitance, and 200-Ω resistance.

Colonies containing the vector were screened by conventional PCR to identify

those containing the vector plus insert. The presence of the insert in the vector and its orientation were assessed by conventional PCR and sequencing by using the primers listed in Table 1. The vector containing the insert was purified from the positive colonies using a Qiagen plasmid midi purification kit (Qiagen), and the concentration of the vector was quantified by using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies/ThermoFisher, Wilmington, DE). The reaction product was linearized by digestion with XmnI restriction endonuclease (Promega). The restricted product was purified and quantified.

The following formula was used to calculate the number of construct gene copies (GC): [concentration of the pGEM-T Easy::insert (ng/μl)/molecular weight (ng/mol)] × 6.022 × 10<sup>23</sup> molecules/mol = the number of molecules of pGEM-T-Easy::insert/μl. The number of GC/μl of the stock prepared for each gene was calculated. Serial decimal dilutions of this stock were made in double-distilled water to prepare the standard curve for qPCR. The standard dilutions were then divided into aliquots and stored at -80°C until use. Three replicates of each dilution were added for each qPCR.

A Custom TaqMan (Applied Biosystems, Spain) set of primers and probe was designed. The forward qcdtB-F/R primer and qcdt-probe with a FAM reporter (FAM, 6-carboxyfluorescein) and an NFQ quencher (nonfluorescent quencher) were used under standard conditions in a Step-One RT-PCR system (Applied Biosystems). *cdtB* genes were amplified in a 20-μl reaction mixture using the TaqMan environmental real-time PCR Master Mix 2.0 (Applied Biosystems). The reaction contained 2 μl of the DNA sample or quantified plasmid DNA. All samples were run in triplicate, along with the standards and positive and negative controls, the number of GC being the average of the three replicates. A 1:10,000 dilution of positive bacterial DNA was used as a positive control.

(ii) **Control of nonphage DNA.** Controls were performed to rule out the presence of bacterial or nonencapsidated DNA. After DNase treatment, but before release of phage DNA from the phage capsid, the samples were used as templates for conventional PCR of eubacterial 16S rRNA genes and for qPCR of the *cdt* (see Table 3). Negative results confirmed that all nonviral DNA was eliminated from the sample and that only genes in phage DNA would be detected.

To screen for PCR inhibition, dilutions of the standard were spiked in the samples containing phage DNA, and the experimental difference was compared to the true copies of the target genes in the standards. Inhibition of the PCR by environmental DNA was not detected.

**Isolation of temperate Cdt bacteriophages and preparation of phage lysates.** *cdt*-positive *E. coli* isolates were grown in 200-ml cultures from single colonies in LB broth at 37°C until reaching the exponential growth phase, determined by an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.3 measured using a spectrophotometer (Spectronic 501; Milton Roy, Belgium). Mitomycin C was added to the cultures to a final concentration of 0.5 μg/ml. These cultures were incubated overnight at 37°C with shaking in the dark. The induced cultures were centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min, and the supernatants were filtered through low-protein-binding 0.22-μm-pore-size membrane filters (Millex-GP; Millipore, Bedford, MA) and treated with DNase (100 U/ml; Sigma-Aldrich, Spain).

**Isolation of phage DNA. (i) Extraction of phage DNA from phage lysates.** Phage lysates were concentrated 100-fold by means of protein concentrators (100-kDa Amicon Ultra centrifugal filter units, Millipore, Bedford, MA) to a final volume of 2.0 ml. Phage DNA was then isolated from the concentrated phage lysates by phenol-chloroform extraction as described previously (32). DNA quantification was performed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. The phage DNA concentration was calculated based on three isolations of phage DNA in three independent experiments.

(ii) **Extraction of phage DNA from environmental samples.** For extraction of phage DNA, 50-ml portions of each water sample were passed through low-protein-binding 0.22-μm-pore-size membrane filters (Millex-GP) and concentrated 100-fold using protein concentrators (100-kDa Amicon Ultra centrifugal filter units; Millipore) to a final volume of 0.5 ml (18). Samples were treated with DNase (100 U/ml of the phage lysate) to eliminate free DNA outside the phage particles. Phage DNA was then extracted as described previously (18).

Purified DNA was eluted in a final volume of 50 μl and evaluated by agarose (0.8%) gel electrophoresis. The bands were viewed following ethidium bromide staining. The concentration and purity of the DNA extracted were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

(iii) **Extraction of bacterial DNA from environmental samples.** Portions (50 ml) of each water sample were passed through 0.45-μm-pore-size polyvinylidene difluoride (PVDF) Durapore membrane filters (Millipore), described by the manufacturer as low-protein-binding membranes. These filters allowed the phages to pass through while bacteria were retained on the surface of the filter. To remove phages retained on the filters, 10 ml of phosphate-buffered saline was added to the surface of the filter, gently agitated, and then removed by filtration.

Two washing steps allowed high (99%) phage reduction without significant loss of bacteria. The membrane containing retained bacteria was recovered in 4 ml of LB. The suspension was centrifuged at 3,000 × *g* for 10 min. To recover DNA from both Gram-positive and Gram-negative bacteria, the pellet was suspended in 180 μl of enzymatic solution (20 mg of lysozyme/ml, 25 mg of lysostaphin/ml, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 2 mM EDTA, 1.2% Triton), followed by incubation for 30 min at 37°C. DNA was then extracted using a QIAamp DNA stool minikit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

**Preparation of DIG-labeled *cdtB*-specific gene probes.** A 466-bp fragment corresponding to *cdtB* resulting from amplification with the primers CDT-up1 and CDT-lp1 (Table 1) was labeled with digoxigenin (DIG) by incorporating DIG-11-deoxy-uridine-triphosphate (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) during PCR as described previously (29) and used as a probe. A DIG-labeled *stx* probe (28) was used to detect double lysogens.

**Infectivity of Cdt phages induced from environmental *E. coli* strains.** To evaluate the ability of the induced Cdt phages to infect diverse host strains, *E. coli* DH5α, *E. coli* C600, and *S. sonnei* 866 were used as hosts. A drop of phage suspension, prepared as described above, was spotted onto a monolayer. The monolayer was prepared with 1 ml of each host strain grown at an OD<sub>600</sub> of 0.3, mixed with 2.5 ml of LB soft agar (LB broth with 0.7% agarose), poured onto LB agar plates, and incubated at 37°C overnight. After incubation, the spot test was transferred to a nylon membrane (Hybond N+; Amersham Pharmacia Biotech, Spain) and hybridized with the *cdtB*-specific probe. Hybridization was performed at 64°C, according to the standard procedure (32) using a DIG-labeled *cdtB* probe prepared as described above. Stringent hybridization was achieved with a DIG-DNA labeling and detection kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

**Construction of lysogens.** Lysogenic phages present in the *cdt*-positive environmental strains were induced as described above. The phage lysates were used to lysogenize the host strains described above (*E. coli* DH5α and C600 and *S. sonnei* 866). A portion (1 ml) of the phage lysate was dropped onto a monolayer containing the host strains prepared as described above. The plates were incubated at 37°C for 18 h. After incubation, bacteria were recovered from the colonies that grew within the drop and then harvested in 1 ml of SM buffer, 10-fold diluted, plated on LB agar, and incubated at 37°C for 18 h. The presence of *cdt* in the colonies was tested by use of a colony hybridization assay (29) with a DIG-labeled *cdtB* probe and confirmed by PCR. The lysogens were subcultured to confirm their stability.

Lysogens were tested for their ability to produce phages after induction. Phages induced from the Cdt lysogens were genotypically and morphologically characterized and compared to those isolated from the wild-type *E. coli* strains using the same procedures.

**Analyses of *cdt* in bacteriophage and bacterial DNA.** Purified phage DNA was digested with ClaI and EcoRI, and purified bacterial DNA was digested with XmnI. The fragments were separated by agarose (0.8%) gel electrophoresis, and bands were visualized by ethidium bromide staining. After electrophoresis, DNA was transferred to nylon membranes (Hybond N+) by capillary blotting (32). Southern blot analysis was performed with a DIG-labeled *cdtB* fragment probe as described above.

**Sequencing of *cdt-V* and flanking regions in phage DNA.** A 3,211-bp ClaI restriction fragment containing *cdt-V* detected in phage DNA was ligated with a ClaI-digested pBC-SK+ vector and transformed by electroporation into *E. coli* DH5α electrocompetent cells as described above.

Nucleotide sequencing of the cloned fragment was performed in triplicate with a model 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Sequencing was carried out with an ABI Prism BigDye 3.1 terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer), plus Cdt primers and primers for the pBC-SK+ vector (Table 1). Sequencing was performed in triplicate. The sequences were assembled by using the software DNA Baser v3.2. Nucleotide sequence analysis and searches for open reading frames (ORFs) and homologous DNA sequences in the EMBL and GenBank database libraries were performed with the tools available from the National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

**Electron microscopy.** The *cdt*-converting bacteriophages present in 20 ml of culture obtained after induction of each strain were purified by CsCl centrifugation (32). The easily visible gray band in which the bacteriophages were expected (11, 32), corresponding to a density of 1.45 ± 0.02 g/ml, was collected and dialyzed to remove the CsCl. A drop of this phage suspension was deposited on copper grids with carbon-coated Formvar films and stained with 2% KOH phosphotungstic acid (pH 7.2) for 2.5 min. Samples were examined in a Hitachi EM 800 electron microscope operating at 80 kV.

**Evaluation of Cdt production.** To determine the production of Cdt by the lysogens, a cell culture assay was used. The Cdt activity of the lysogens in HeLa



TABLE 2. Characterization of *cdt*-positive STEC environmental isolates<sup>a</sup>

Strain	Origin <sup>b</sup>	Serotype	<i>stx</i> gene	Stx phage	<i>cdt</i> gene	Cdt phage	Induction <sup>c</sup>	Induction (OD <sub>600</sub> )		<i>E. coli</i> DH5α		<i>E. coli</i> C600		<i>S. sonnei</i> 866	
								- MitC	+ MitC	Plate	Hybridization	Plate	Hybridization	Plate	Hybridization
22	C	O98:HNT	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	<i>cdt-III</i>	-	3.1 × 10 <sup>4</sup>	1.615	0.636	-	-	-	-	-	-
<b>47</b>	C	<b>O91:H21</b>	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	<i>cdt-V</i>	+	6.4 × 10 <sup>5</sup>	1.791	0.508	++	+	++	-	-	+
49	C	O116:H-	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2g</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	1.4 × 10 <sup>1</sup>	1.728	0.371	+	+	+	-	+	-
<b>62</b>	C	<b>O22:H8</b>	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	<i>cdt-V</i>	+	7.6 × 10 <sup>5</sup>	1.722	0.521	+	-	+	-	-	+
63	C	O113:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2g</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	9.7 × 10 <sup>2</sup>	1.624	0.438	+	+	+	-	+	-
68	C	O89:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub> , <i>stx</i> <sub>2g</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	4.1 × 10 <sup>2</sup>	1.633	0.259	+	+	+	-	-	-
74	C	O162:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2g</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	2.2 × 10 <sup>1</sup>	1.449	0.367	+	-	+	-	+	-
75	C	O116:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2g</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	7.0 × 10 <sup>2</sup>	1.238	0.349	+	+	+	-	+	-
<b>78</b>	C	<b>O89:H19</b>	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	<i>cdt-V</i>	+	1.2 × 10 <sup>5</sup>	1.550	0.837	-	-	-	-	-	+
<b>115</b>	C	<b>O91:H21</b>	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	<i>cdt-V</i>	+	7.2 × 10 <sup>5</sup>	1.664	0.786	-	-	-	-	-	+
123	C	O113:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	+	<i>cdt-I</i>	-	1.4 × 10 <sup>3</sup>	1.620	0.353	++	-	++	-	++	-
<b>125</b>	C	<b>O157:H7</b>	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	<i>cdt-V</i>	+	8.2 × 10 <sup>4</sup>	1.533	0.842	+	-	+	-	-	+
126	H	O91:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	3.7 × 10 <sup>2</sup>	1.675	0.676	+	-	+	-	-	-
130	C	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	1.0 × 10 <sup>2</sup>	1.349	0.572	-	-	-	-	-	-
131	H	ONT	<i>stx</i> <sub>2f</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	3.3 × 10 <sup>2</sup>	1.473	0.511	+	-	-	-	+	-
253	C	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	4.1 × 10 <sup>2</sup>	1.365	0.845	-	-	-	-	-	-
273	C	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	<i>cdt-V</i>	-	1.1 × 10 <sup>3</sup>	1.341	0.862	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> The table shows the types of *stx* and *cdt* genes and gives results for the presence of inducible bacteriophages as determined by evaluation of the ODs (absorbance units) of the cultures. Cdt bacteriophages induced from the strains after spot test on three host strains were visualized directly on the plate, and after hybridization with *cdtB* probe, scored as follows: +, low lytic spot; ++, strong lytic spot; and -, negative. Strains and serotypes indicated in boldface showed clear lytic spots after hybridization. MitC, mitomycin C.

<sup>b</sup> C, wastewater with cattle fecal pollution; H, urban sewage.

<sup>c</sup> Expressed as *cdt* copies in phage DNA per ml of induced culture. Values were determined by real-time qPCR in phage DNA extracted from the cultures.

cells was determined by using various dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/20, and 1/50) of filtered supernatants from the overnight cultures of strains in Trypticase soy broth. The distending effect was evaluated at the highest dilution that caused 50% of the HeLa cells in a well to be distended up to 96 h of incubation.

Production of toxin was compared for each strain with or without mitomycin C induction and with *S. sonnei* 866 as the negative control. For this purpose, bacteria were grown from single colonies in LB at 37°C to the exponential growth phase, measured as described above. At this point, each culture was divided into two aliquots, and mitomycin C was added to one of the aliquots as described above for bacteriophage induction. Bacteria were then incubated at 37°C for 18 h. The cultures were centrifuged at 12,000 × g for 10 min, and the supernatant was filtered through 0.22-µm-pore-size membrane filters (Millex-GP).

**Environmental samples. (i) Urban sewage.** We used 34 sewage samples collected from the influent of an urban sewage plant that serves the urban area of Barcelona, including a number of cities and towns, of approximately 500,000 inhabitants. No animal fecal contamination was expected in these samples. A total of 16 of these samples were used for phage DNA analysis; the remaining 18 samples were used for bacterial DNA analysis.

**(ii) Cattle wastewater.** Fifteen samples containing exclusively fecal contaminants of cattle origin were collected from slaughterhouse wastewater effluents. No human fecal contamination was expected in these samples.

The urban sewage and animal samples were collected regularly approximately every 15 days over 7 months. Portions (50 ml) of each sample were analyzed. Bacterial and phage DNA was isolated from these samples as described above, in order to determine the presence of *cdt-V* in the bacteriophage and bacterial fractions of the environmental samples.

**Isolation of *cdt*-positive *E. coli* isolates.** The prevalence of *cdt* in non-Shiga-toxin-producing *E. coli* isolates was also assessed. For this, serial decimal dilutions of sewage samples were filtered through 0.45-µm-pore-size membranes (EZ-Pak Filters; Millipore). The membranes were then transferred onto Chromocult coliform agar (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 37°C for 24 h. Enumeration of the *E. coli* bacteria was performed by counting the blue colonies grown on the plate. Later, plates from dilutions presenting heavy but nonconfluent colony growth were selected for colony transfer, which was performed by carefully placing a nylon membrane onto the surface of the agar and quickly peeling it from the plate. The bacterial cells on the membranes were then lysed and fixed, and the membranes were hybridized, as described previously (13), using DIG-labeled *cdtB*. Colonies showing a positive hybridization signal were confirmed by PCR for the presence of *cdt*.

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence of the 3,211-bp fragment of phage Φ125 containing the *cdt-V* gene cluster was submitted to the GenBank database library and assigned accession number JF461073.

RESULTS

**Screening for Cdt phages in the environmental STEC collection.** The presence of *cdt* and different *cdtB* variants in an *stx*<sub>2</sub>-positive *E. coli* collection of 140 strains isolated from different nonclinical water samples containing human and cattle fecal pollution was screened using a multiplex PCR (Table 1). The prevalence of *cdt* in the collection was 12.1% (Table 2). The presence of *cdt* was confirmed by colony blot hybridization with the DIG-labeled *cdtB* probe (Fig. 1A). Specific primers for variants Cdt-I to Cdt-V (Table 1) were used to characterize the *cdt* variant in each strain, and the results (Table 2) showed a higher prevalence (89.5%) of *cdt-V* among the isolates. The strains were also characterized for the presence of Stx2 variants, as previously described (13).

To determine whether *cdt* was located in the genome of an inducible prophage, phages were induced with mitomycin C. Induction was measured by a reduction of the OD<sub>600</sub> of the

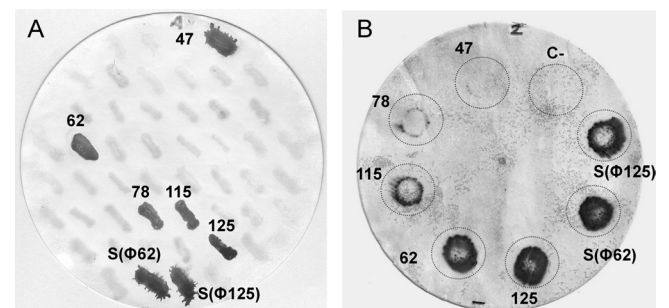


FIG. 1. Colony hybridization showing the *cdt*-positive strains (47, 62, 78, 115, and 125) and the Cdt lysogens S(Φ62) and S(Φ125) obtained using *S. sonnei* as the host strain (A) and plaque blot hybridization with the *cdtB*-DIG probe of phages spotted onto the *S. sonnei* host strain (B).



bacterial culture, which indicates activation of the lytic cycle of induced prophages (Table 2). In parallel, since the strains were *stx*<sub>2</sub> positive, the presence of inducible Stx2 bacteriophages was also evaluated by PCR (Table 2).

Many strains showed a reduction of the optical density after mitomycin C treatment, indicating induction of the lytic cycle by activation of temperate phages present in the strains. This reduction can be caused by Cdt phages or other inducible bacteriophages (such as Stx phages or others). Accordingly, an area of lysis corresponding to the drop of the phage lysate obtained from cultures of the *cdt*-positive strains was observed on an agar monolayer containing bacterial host strains *E. coli* C600, *E. coli* DH5 $\alpha$ , and *S. sonnei* 866. To confirm the presence of inducible Cdt phages in the phage suspension, real-time qPCR demonstrated the presence of inducible Cdt phages from the strains although differential rates of induction were observed among the strains. Moreover, to detect infectious Cdt phages, we hybridized the lytic spot with the DIG-labeled *cdtB* probe. Infectious Cdt phages were confirmed (Table 2) in five *cdt*-positive environmental strains (strain 47, serotype O91:H21; strain 62, serotype O22:H8; strain 78, serotype O89:H19; strain 115, serotype O91:H21; and strain 125, serotype O157:H7), giving a rate of detection of inducible phages of 29.4%. The *cdt* variant in these phages was again confirmed as *cdt-V* using the specific set of primers and sequencing, with the present study providing the first description of inducible bacteriophages carrying the *cdt-V* variant. None of the five phages produced clear lytic areas on the agar monolayer with *S. sonnei* (Table 2), but all showed positive signals after hybridization (Fig. 1B), some signals being stronger (phages  $\Phi$ 62,  $\Phi$ 115, and  $\Phi$ 125) than others (phages  $\Phi$ 47 and  $\Phi$ 78). Positive hybridization signals were not observed for the *E. coli* strains. The levels of Cdt phage induction of the *cdt*-positive strains were evaluated by real-time qPCR.

**Isolation of Cdt phages from the STEC strains and generation of lysogens.** Cdt phages were propagated after induction of 200-ml cultures of strains 47, 62, 78, 115, and 125. Lysogens were generated to check the ability of Cdt phages to integrate within a host and to transduce *cdt*. Working with lysogens also prevents possible interference from other phages, which might be present in the wild-type strains, as the experiments described below revealed. We tried to produce lysogens for the Cdt phages and we were successful in producing *cdt* lysogens for two of these, corresponding to phages  $\Phi$ 62 and  $\Phi$ 125, using *S. sonnei* as the recipient strain, generating lysogens S( $\Phi$ 62) and S( $\Phi$ 125) (Fig. 1A). After several attempts, no lysogens were obtained from *E. coli* strain C600. Lysogens S( $\Phi$ 62) and S( $\Phi$ 125) were again able to produce infectious Cdt phages, which showed positive hybridization signals in *S. sonnei* after induction (Fig. 1B). Lysogens S( $\Phi$ 62) and S( $\Phi$ 125) were subcultured to confirm their stability, and our observations indicated the stability of the phage within the lysogen.

**Morphological characterization of Cdt phages.** Electron microscopy observations showed the presence of phages in both lysogens S( $\Phi$ 62) and S( $\Phi$ 125). These phages corresponded to the *Siphoviridae* morphology (11) with a capsid of  $45 \pm 2$  nm in diameter and a noncontractile tail of  $150 \times 10$  nm (Fig. 2A). However, during evaluation of the phage lysate induced from lysogen S( $\Phi$ 62), a second phage, of a different morphological type, was observed. This second phage was present in lower

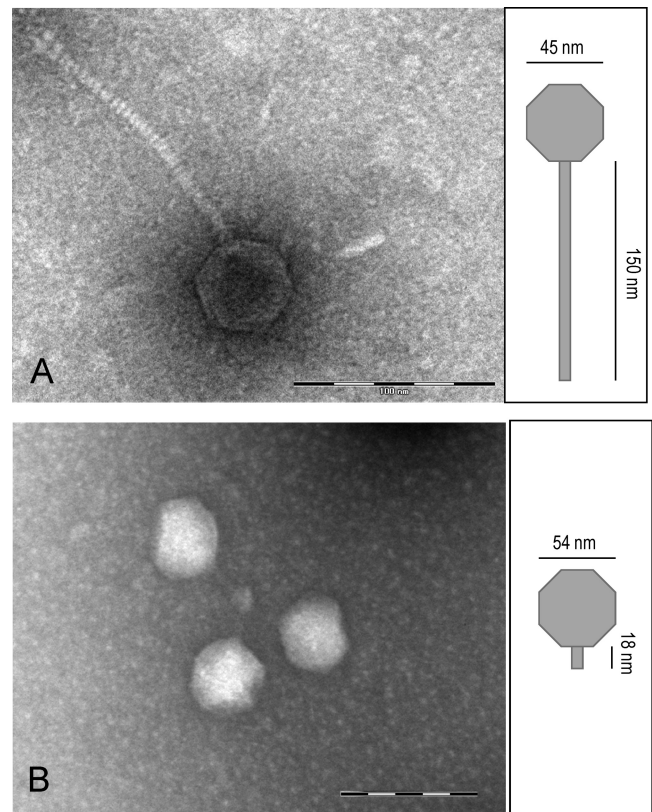


FIG. 2. Micrographs of Cdt phages and Stx phages induced from lysogens. (A) *Siphoviridae* morphological type of bacteriophages induced from lysogens S( $\Phi$ 62) and S( $\Phi$ 125). (B) *Podoviridae* morphological type of bacteriophages induced from lysogen S( $\Phi$ 62). Bar, 100 nm.

numbers (ratio 1/100 compared to the first one) and corresponded to the *Podoviridae* morphology (11) with a capsid of  $51 \pm 2$  nm in diameter and a short tail (Fig. 2B).

**Double lysogeny in strain S( $\Phi$ 62) and spontaneous induction of Cdt phages.** Double lysogeny (Cdt phage and Stx phage) in strain S( $\Phi$ 62) was suspected after electron microscopy examination. Since the wild-type strain 62 also harbored an inducible Stx phage, it is likely that this phage was transferred at the same time as the Cdt phage to the host strain. PCR analysis with the primers S2Aup/lp and UP378/LP378 (Table 1) confirmed the presence of *stx* in lysogen S( $\Phi$ 62) but not in lysogen S( $\Phi$ 125). This is the first description of two phages harboring two different toxins being simultaneously transferred to a host strain without using any kind of selection.

Differential induction rates of Cdt phages from the two lysogens, S( $\Phi$ 62) and S( $\Phi$ 125), was evaluated by real-time qPCR (primers and probes in Table 1), designed to detect *cdtB-V*. After mitomycin C induction a reduction in the absorbance of the cultures ( $OD_{600}$ ) was observed. The wild-type strains (62 and 125) and lysogen S( $\Phi$ 62) showed a reduction in absorbance from 0.7 to 1.2 U but no differences in absorbance ( $<0.2$  U) were observed for lysogen S( $\Phi$ 125). Phage DNA was extracted from the phages present in the supernatant of cultures of the wild-type strains and their lysogens, with or without mitomycin C treatment. A portion (10  $\mu$ l) of this DNA was

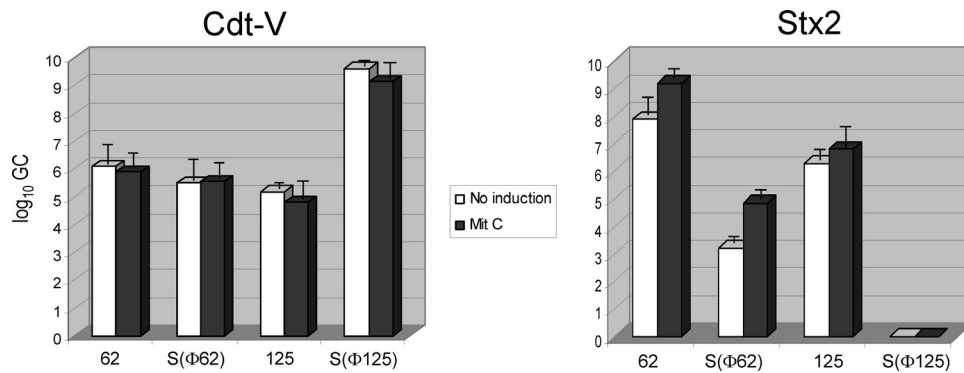


FIG. 3. Densities of Cdt phages (log<sub>10</sub> GC) and Stx phages (log<sub>10</sub> GC) with or without mitomycin C induction from wild-type strains 62 and 125 and lysogens S(Φ62) and S(Φ125), as evaluated by real-time qPCR.

used as a template to quantify the number of GC of *cdtB*. Since Cdt phages are only known to carry one *cdt* copy, the *cdt* GC values can be extrapolated to the number of Cdt phages in each sample. The number of Cdt phages induced from the two lysogens was compared to those from the respective wild-type strains and the induced and noninduced cultures (Fig. 3). The presence of *cdt-V* in phage DNA was clearly observed but induction appeared to be independent of the presence of mitomycin C, since no significant differences (Student *t* test, *P* > 0.05) in the densities of Cdt phages were observed between induced and noninduced cultures. Cdt phages seem to be released spontaneously.

To confirm the simultaneous transduction of Stx and Cdt phages in lysogen S(Φ62) and to evaluate the rates of induction of both phages, analysis by qPCR with a set designed for *stx* (Table 1) was carried out in parallel to detect *stx* genes in phage DNA from the wild types and the lysogens. The presence of inducible Stx phages was confirmed in the wild-type strains 62 and 125, as well as in lysogen S(Φ62). As expected, Stx phages were not detected in lysogen S(Φ125). In this case, in contrast to Cdt phages, the densities of Stx phages (GC) showed a significant (Student *t* test *P* < 0.05) increase after mitomycin C induction (Fig. 3).

**Cdt-V phages insert into a different site than the CDT-1Φ phage.** To identify the putative site of insertion of Cdt-V phages, we analyzed a previously described insertion site for phage CDT-1Φ in both the wild-type strain and the lysogen. The results indicate that Cdt-V phages were not inserted into the same site, since this chromosomal site, evaluated using the primers B1 and B2 (Table 1), appeared intact. Moreover, these phages have different *attP* sequences than phage CDT-1Φ since no amplicon was obtained with primers P1 and P2 (Table 1), as previously described by Asakura et al. (1).

**Sequencing of *cdt* flanking regions.** Since lysogen S(Φ62) harbors two phages, characterization of a Cdt-V phage continued using phage Φ125 induced from the single lysogen S(Φ125). The insertion of this phage in the lysogen was confirmed by Southern blot analysis of XmnI restricted chromosomal DNA of the lysogen and hybridization with the *cdt* probe (Fig. 4A). In order to sequence the complete *cdt-V* and, if possible, its flanking regions, phage Φ125 DNA was also analyzed by Southern blot hybridization (Fig. 4B). ClaI restriction of DNA of phage Φ125 identified a 3,211-bp band containing

the *cdt* gene. This fragment was cloned within a pBC-SK vector and sequenced. The sequence of the fragment confirmed that this phage harbored *cdt-V* (Fig. 4C and Table 3). The *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes showed a similarity of 100% with previous *cdt* sequences, some of them identified as *cdt-V* (4, 19). The fragment also contained a truncated ORF downstream from *cdtC* that shows homology with the replication protein A of bacteriophage P2 (24).

**Expression of Cdt by lysogens evaluated by HeLa cell assay.**

After 5 days of incubation, sterile filtrates from lysogen S(Φ125) were analyzed using HeLa cells. Distension of the cells allowed confirmation of the expression of Cdt in the supernatant of lysogen S(Φ125). Cultures were grown in the presence or absence of mitomycin C, and a similar distending effect was observed in both cultures (Fig. 5). No morphological changes were observed in the controls of the host strain *S. sonnei* (Fig. 5). In addition, we performed dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/20, and 1/50 of the supernatants of lysogen S(Φ125) grown in the presence or absence of mitomycin C. The distending effect was observed in the cells from dilution 1/8 on-

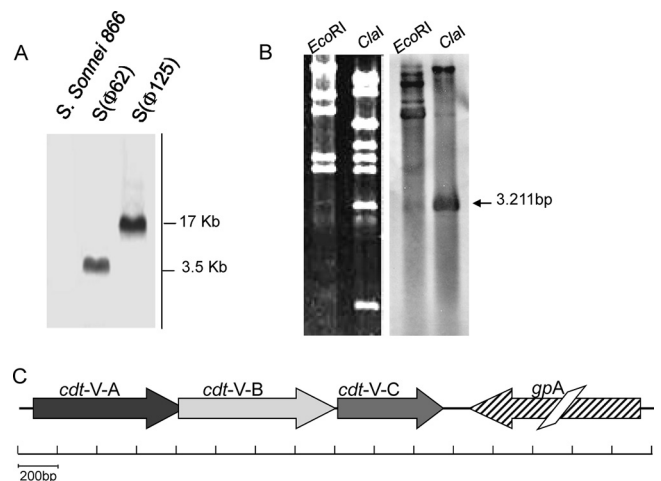


FIG. 4. Southern blot analysis for detection of *cdt* fragment in an XmnI-restricted bacterial DNA from *S. sonnei* 866, lysogens S(Φ62) and S(Φ125) (A); in ClaI- and EcoRI-restricted phage DNA obtained from lysogen S(Φ125) (B); and genetic organization of the 3,211-bp ClaI fragment of phage Φ125 (C).

TABLE 3. Sequence comparison of ORFs detected in the 3,122-bp fragment sequenced from phage  $\Phi$ 125 with previously published sequences

ORF	Position (bp)	Size (bp)	Identified gene	Description	Most similar sequence <sup>a</sup>	% Similarity <sup>b</sup>	Reference
ORF1	76–852	777	<i>cdtA-V</i>	Cytolethal distending toxin V A subunit Binding protein for delivering CdtB into target cells	gb AY365043.1  CdtA-V in <i>E. coli</i> strain 5249/01	100	4
ORF2	849–1658	810	<i>cdtB-V</i>	Cytolethal distending toxin V B subunit catalytic subunit	gb AY365043.1  CdtA-V in <i>E. coli</i> strain 5249/01	100	4
ORF3	1673–2218	546	<i>cdtB-V</i>	Cytolethal distending toxin C subunit binding proteins for delivering CdtB into target cells	gb AY365043.1  CdtA-V in <i>E. coli</i> strain 5249/01	100	4
ORF4	2329–3211 (truncated)	882	<i>gpA</i> (fragment)	Phage protein A; DNA replication; makes site-specific nick at origin of replication	gb AF063097.1  bacteriophage P2; complete genome; gene "A"	97	24

<sup>a</sup> The GenBank (gb) accession numbers are indicated.

<sup>b</sup> That is, the percent similarity to the most similar sequence in the previous column.

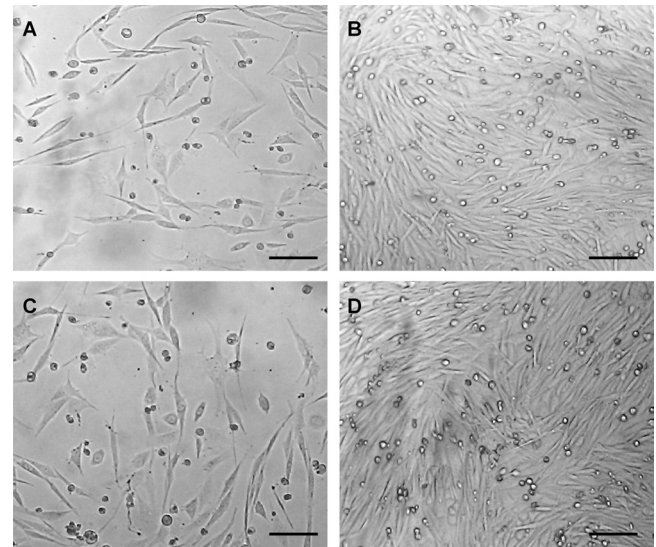


FIG. 5. Distending effect of sterile culture filtrates from lysogen S( $\Phi$ 125) on HeLa cells after 96 h of incubation. (A and C) Lysogen S( $\Phi$ 125) with and without mitomycin C induction, respectively. (B) *S. sonnei* strain 866. (D) HeLa cells incubated for 96 h. Bar, 200  $\mu$ m.

ward in both cultures, suggesting that the amounts of Cdt present in the supernatants with or without mitomycin C were similar.

Evaluation of Cdt expression in the wild-type strain 125, strain 62, and lysogen S( $\Phi$ 62) was not possible since the distending effects were masked by the cytotoxic effect occurring after 48 to 72 h, probably caused by the Stx produced by these strains, and therefore the cell culture was destroyed before the Cdt distending effect was visible.

**Quantification of free Cdt phages and bacteria in environmental samples.** Since Cdt temperate phages have been isolated from strains of environmental origin, we decided to evaluate their presence in nonclinical environments. To evaluate this question, real-time qPCR, which allows detection of the B subunit of the *cdt-V* variant, was set up to evaluate its presence in phage DNA isolated from human urban sewage and wastewater containing cattle fecal pollution.

The *cdt* gene was detected in phage DNA isolated from more than 62.5% of the samples of urban sewage and in 73.3% of the cattle wastewater analyzed, with an average density of  $10^3$  GC/100 ml for both types of sample (Fig. 6). The percentage of positive samples in this set of experiments, as well as the high maximal densities of *cdt-V* in the phage DNA of some of the samples, indicates that free Cdt phages are quite common in fecally polluted samples, although the densities of *cdt-V* GC found in the same type of samples were not homogeneous. Controls confirmed that this was not due to contamination of DNA other than phage DNA and enabled us to rule out the presence of inhibitors in the environmental samples analyzed.

*cdt* was also present in the bacterial fraction of the sewage samples analyzed. *cdt* was detected in bacterial DNA isolated in >88% of the urban sewage samples, and only two samples were negative for bacterial DNA analysis. The densities of *cdt* in bacterial DNA were more homogeneous than those ob-



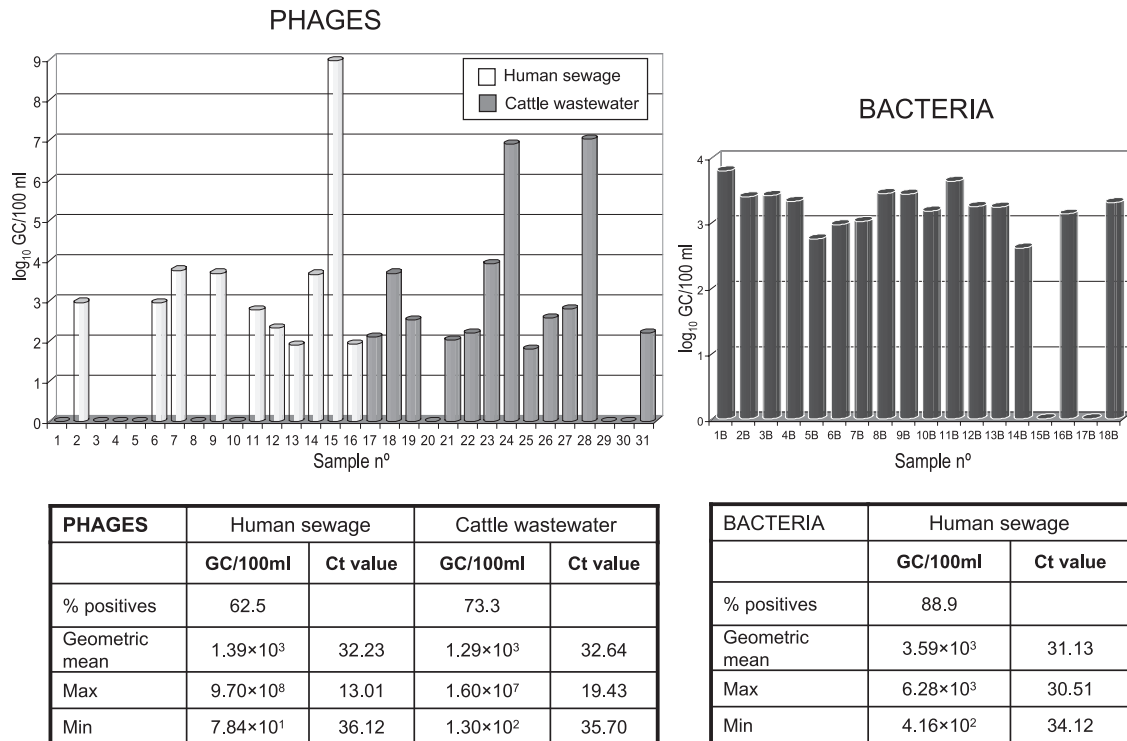


FIG. 6. The left chart shows the densities of *cdt* genes ( $\log_{10}$  GC/100 ml) in phage DNA isolated from 16 urban sewage samples and 15 wastewater samples from cattle. The left table summarizes the percentages of positive samples, geometric means, and maximum and minimum values of *cdt-V* (GC/100 ml) in phage DNA isolated from the human and cattle samples. The right chart and table show the densities of *cdt* genes ( $\log_{10}$  GC/100 ml) in bacterial DNA isolated from 18 urban sewage samples.

served in phage DNA, with an average density of  $3.5 \times 10^3$  GC/100 ml (Fig. 6).

**Isolation of *cdt* in environmental *E. coli* isolates.** To elucidate the prevalence of *cdt* genes and Cdt inducible phages in wild-type isolates of *E. coli* in the environment, independently of the presence of *stx*, we searched for *cdt*-positive *E. coli* in eight independent sewage samples by colony blotting. We isolated six *E. coli* strains (Table 4), which means a percentage of *cdt* in non-STEC *E. coli* isolates between 0.05 and 1.18% of the densities of *E. coli* grown in Chromocult agar. Among these, the variant most frequently detected was *cdt-IV*. The presence of inducible prophages was deduced by reduction of the absorbance of the cultures, and the presence of inducible Stx

phages was confirmed by real-time qPCR. Cdt phage induction was independent of mitomycin C since no differences in the *cdt* copies in phage DNA were observed when comparing cultures treated with or without mitomycin C. However, none of these strains carried Cdt phages capable of infecting and generating lysogens using *S. sonnei* as the host strain.

DISCUSSION

The STEC strains analyzed in this study are nonclinical isolates, isolated from fecally polluted water on the basis of the presence of Stx. The incidence of *cdt* in the environmental collection was similar to that in clinical isolates (3, 4, 12, 19),

TABLE 4. Occurrence of *cdt*-positive *E. coli* environmental isolates<sup>a</sup>

Sewage sample no.	<i>E. coli</i> CFU/ml	% of Cdt <sup>+</sup> <i>E. coli</i> strains <sup>b</sup>	<i>stx</i> gene	<i>cdt</i> gene	Cdt phage	Induction <sup>c</sup>		Induction (OD <sub>600</sub> )		<i>S. sonnei</i> 866	
						- MitC	+ MitC	- MitC	+ MitC	Plate	Hybridization
1	2.4 × 10 <sup>5</sup>	0.05	-	<i>cdt-IV</i>	-	8.5 × 10 <sup>2</sup>	3.4 × 10 <sup>2</sup>	1.481	0.760	-	-
2	8.5 × 10 <sup>4</sup>	0.25	-	<i>cdt-IV</i>	-	9.4 × 10 <sup>2</sup>	3.9 × 10 <sup>2</sup>	1.548	0.406	+	-
3	1.6 × 10 <sup>4</sup>	1.18	-	<i>cdt-IV</i>	-	7.3 × 10 <sup>2</sup>	9.4 × 10 <sup>2</sup>	1.459	0.893	-	-
4	4.5 × 10 <sup>4</sup>	0.89	-	<i>cdt-IV</i>	-	2.2 × 10 <sup>3</sup>	1.1 × 10 <sup>2</sup>	1.415	0.435	-	-
		0.89	-	<i>cdt-I</i>	-	1.4 × 10 <sup>3</sup>	8.7 × 10 <sup>2</sup>	1.469	1.059	+	-
5	6.0 × 10 <sup>4</sup>	0.33	-	<i>cdt-IV</i>	-	5.1 × 10 <sup>3</sup>	8.2 × 10 <sup>2</sup>	1.413	0.418	-	-

<sup>a</sup> The table gives the percentage of *cdt*-positive *E. coli* strains among the total *E. coli* counts for each sewage sample. The type of *cdt* and the presence of Cdt inducible bacteriophages were determined from the ODs (absorbance units) of the cultures. Cdt bacteriophages induced from the strains after spot test on *S. sonnei* were visualized directly on the plate and, after hybridization with the *cdtB* probe, scored as follows: +, low lytic spot; ++, strong lytic spot; and -, negative. MitC, mitomycin C.

<sup>b</sup> That is, the percentage of *cdt*-positive colonies among the total *E. coli* population (CFU/ml) grown in Chromocult agar (indicated in the previous column).

<sup>c</sup> Expressed as *cdt* copies in phage DNA per ml of induced culture. Values were determined by real-time qPCR in phage DNA extracted from the cultures.

showing that Cdt-producing STEC strains, which may represent a potentially novel virulence clone (40), are present in the environment. The prevalence of *cdt-V* in our *cdt*-positive strains was very high. Among these, the prevalence of *cdt-V* in non-O157 serotypes (8.6%) was similar to previous data (12), although it should be noted that our collection was mainly composed of non-O157 serotypes (only 11 O157:H7 among the 140 isolates), since serotype O157:H7 is not commonly found in environmental settings (13). Despite the low frequency of O157:H7 in our collection, four of these strains harbored *cdt* (36.4%). Janka et al. (19) reported that the *cdt-V* allele is present in the majority of sorbitol-fermenting *E. coli* O157:NM strains. Later on, *cdt-V* was also reported in 5% of non-O157 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) clinical isolates (4). In our study, *cdt-V* was also found in three isolates of serotype O91:H1. There were five isolates of serotype O91:H21 in our collection (data not shown), and although the number of isolates was low, *cdt* showed a prevalence of 60% in this serotype, which is in accordance with previous reports (3, 22) that showed a prevalence of 70% in larger strain collections. Some authors have suggested that some serotypes lacking important virulence factors harbor *cdt* and that *cdt* may therefore contribute to the pathogenicity of these strains. Our STEC strains, like those described previously (12), lack many virulence genes, such as *eae* (data not shown), which encodes intimin (20). As suggested in the latter report, this underlines the virulence potential of Cdt-V.

A novelty of the present study is that *cdt-V* was found in an inducible Cdt bacteriophage. The location of *cdt-V* in phages, although not demonstrated experimentally, has been suggested previously (12, 40) and is supported by the P2 sequences or lambdoid phage sequences found in the flanking regions of *cdt-V* in several bacterial isolates. Inducible phages were detected in all *cdt*-positive strains in the present study, but the numbers of Cdt phages detected after induction were different. The isolates inducing more phages were those generating infectious Cdt phages detected with *S. sonnei*, and two of them generated lysogens, perhaps because the number of phages induced increases the chances of infection and subsequent transduction. Difficulties with regard to isolating and detecting Cdt phages were confirmed here, and we were only able to obtain good results when we used the *S. sonnei* strain as a host. The lack of signals when using *E. coli* as the host strain, as well as the weak signals obtained with some Cdt phages in *S. sonnei*, indicates that the presence of Cdt-inducible bacteriophages in previous studies could have been underestimated. Although we do not know the reason why this strain is a good host for temperate phages, this *S. sonnei* strain had previously shown good abilities to generate lysogens of temperate Stx bacteriophages (28, 33). This is the reason why we used it here for the detection of Cdt phages and generation of lysogens.

The Cdt-V phages analyzed here were produced at high rates in the absence of an inducing agent such as mitomycin C; therefore, they are produced by spontaneous induction (25). This was observed in the wild-type strain, as well as in the lysogens. Variation in the rates of phage induction was observed as a reduction in the absorbance units when adding mitomycin C to the cultures; however, this approach is not conclusive when strains carry more than one temperate phage. This was the case with the wild type and with lysogen S( $\Phi$ 62),

which both carry a Stx phage, together with the Cdt phage. In contrast, no variation in the optical density was observed for lysogen S( $\Phi$ 125), apparently only carrying a Cdt phage. Confirmation of the spontaneous release of Cdt phages was achieved after evaluation of Cdt phage induction by qPCR. This mitomycin C-independent induction contrasts with the induction of phage CDT-1 $\Phi$  (1), which was only produced by mitomycin C-induced cultures and not in the absence of mitomycin C.

Accordingly, expression of the Cdt occurred in the S( $\Phi$ 125) lysogen, independently of mitomycin C induction, since the same distending effect was observed in the presence or absence of mitomycin C and at the same dilution of the supernatant. It was not possible to observe the effect of Cdt in lysogen S( $\Phi$ 62) or in the STEC wild-type strains, since the cytotoxic effect of Stx destroyed the cell culture before any distending effect could be observed.

If we assume that *stx* is mobilized by bacteriophages, and given that the present study and previous reports suggest that many *cdt* variants are also located in the genome of inducible or noninducible bacteriophages, then it is reasonable to think that in those strains harboring both genes, double lysogeny has occurred at some point during their evolution. Since many STEC strains are reported to harbor *cdt* (3, 4, 12), double lysogeny of Cdt and Stx phages should be a common event. However, this simultaneous transduction of both phages without any kind of selection has never been demonstrated experimentally before now. Previous reports from our group indicated that double lysogeny, proposed as a mechanism to increase genetic variability among strains, seems to occur at higher rates than single lysogeny (34). A second phage seems to be introduced into a previously lysogenized strain more easily than in a nonlysogenic strain. Moreover, triple lysogeny can be achieved more easily than double lysogeny (R. Serrano-Moreno, unpublished data). This applies to different Stx phages but also to the same Stx phage, which conflicts with the outcome expected according to the model of immunity to superinfection proposed for phage  $\lambda$ . This has also been demonstrated by other authors (10), indicating that double and triple lysogens of a single phage are routinely detected from a single infection of a double lysogen.

Once in the same background, both phages are induced, although at different rates and obviously through different pathways. The Stx phage is activated through the SOS system (23, 43), and although SOS-independent spontaneous induction has also been demonstrated (25), the number of Stx phages increased after SOS activation. The Cdt-V phage described here seemed to be induced independent of mitomycin C treatment in the same bacterial background, indicating a spontaneous release, a mechanism independent of inducing agent (25), that could involve the bacterial integration site or the phage biology itself.

Characterization of the Cdt-V phage showed a phage of *Siphoviridae* morphology, similar to the CDT-1 $\Phi$  phage described by Asakura et al. (1). The Cdt-V operon in this phage is flanked by a bacteriophage region showing homology with a fragment of the *gpA* encoding a protein from phage P2. The *gpA* is truncated in the 3' region by the insertion of the *cdt* operon, suggesting an insertion event that must cause the disruption of *gpA*. Homology with P2 in the flanking regions of

the *cdt-V* cluster has been widely reported (12, 40), indicating a common trend for this cluster. On the contrary, the *cdt-I* and *cdt-IV* flanking sequences are not related to P2 phage genes (1, 40). For example, in CDT-1Φ, the *cdtI* cluster is located adjacent to and upstream of the integrase gene. Another difference in Cdt-V phages from our study is that they do not insert within the *S. sonnei* or *E. coli* genome at the same site as described for CDT-1Φ, since the site was not occupied in either strain containing the *cdt-V* phage. Moreover, the primers used to amplify the attP regions in CDT-1Φ are not useful for Cdt-V phages. Variability among phages harboring the same toxin is not surprising, because the mosaic structure of bacteriophages means that many of them could interchange different fragments of diverse origin.

Given that Cdt phages were easily induced from STEC strains present in nonclinical settings, free Cdt phage particles could be found among the healthy human population. Therefore, we screened wastewater samples containing human and cattle fecal pollution in which free Cdt-V phages could be expected. These values were compared to the prevalence of *cdt* in bacterial DNA of the sewage samples. Our approach allowed us to isolate DNA from Gram-positives and Gram-negatives, which include *E. coli* as well as other genera. Urban sewage was selected based on its relationship with human pathogenicity, and cattle wastewater was selected since cattle are a major source of STEC, to which *cdt-V* is related. The presence of *cdt* in the viral DNA fraction of the environmental samples suggests that phages act as a reservoir of *cdt* genes, as previously shown for Stx phages (18, 27, 37) or phages carrying antibiotic resistance genes (26). It seems likely that Cdt phages, found as free particles in wastewater, could behave as reservoirs of *cdt* in the environment. Moreover, if some of these phages are spontaneously induced, they could be released from bacterial strains after induction and found as free particles even in the absence of an SOS response-inducing agent. *cdt* has also been detected in bacterial DNA from environmental samples. Densities are similar to those of phages, but with more homogeneous values among samples. Evaluation of *cdt*-positive, non-STEC, *E. coli* environmental isolates showed a lower prevalence of *cdt* (0.3 to 1.2%) than in our collection of STEC strains (12%). However, the prevalence of STEC in the same type of urban sewage, which is 0.1% (13), must be considered. Differences among these studies and real-time qPCR results can be explained by the fact that the previous approach is limited to those *E. coli* strains able to grow on Chromocult, while real-time qPCR evaluates any kind of bacterial DNA independently of the viability of the strain and its ability to grow in Chromocult.

It is interesting that in the six non-STEC *E. coli* environmental isolates, Cdt-IV was the predominant variant, rather than Cdt-V, which appears to be more prevalent among STEC strains. However, the number of *cdt*-positive, non-STEC environmental isolates is too low to consider these data to be any more than a mere indication. These isolates were able or not able to induce Cdt phages at high rates according to the real-time qPCR results. Consequently, no lysogens were obtained with these phages. The significant presence of Cdt-V phages in environmental strains correlates with the fact that Cdt-V phages are present as free particles in wastewater, in which phages are known to be highly resistant to inactivation pro-

cesses (2, 35) and from where they can infect and transduce *cdt-V* to environmental strains, causing the emergence of new Cdt-producing bacteria.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Andreu García Vilanova and Aiora Aregita for excellent technical assistance.

This study was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2009-07576), and the Xarxa de Referència en Biotecnologia. A.A.-G. was supported by a grant FI from the Generalitat de Catalunya, Catalonia, Spain.

#### REFERENCES

- Asakura, M., et al. 2007. An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104**:14483–14488.
- Baggi, F., A. Demarta, and R. Peduzzi. 2001. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. Res. Microbiol. **152**:743–751.
- Bielaszewska, M., et al. 2009. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. J. Clin. Microbiol. **47**:2061–2066.
- Bielaszewska, M., et al. 2004. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. Infect. Immun. **72**:1812–1816.
- Boesze-Battaglia, K., et al. 2006. Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal-distending toxin. Cell Microbiol. **8**:823–836.
- Canchaya, C., C. Proux, G. Fournous, A. A. Bruttin, and H. Brüßow. 2003. Prophage genomics. Microbiol. Mol. Biol. **67**:238–276.
- Cangelosi, G. A., N. E. Freitag, and M. R. Buckley. 2004. From outside to inside: environmental microorganisms as human pathogens. American Academy of Microbiology Report. ASM, Washington, DC.
- Canton, R. 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. Clin. Microbiol. Infect. **1**:20–25.
- Clark, C. G., S. T. Johnson, R. H. Easy, J. L. Campbell, and F. G. Rodgers. 2002. PCR for detection of *cdt-III* and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle. J. Clin. Microbiol. **40**:2671–2674.
- Fogg, P. C., et al. 2007. Identification of multiple integration sites for Stx-phage Phi24B in the *Escherichia coli* genome, description of a novel integrase and evidence for a functional anti-repressor. Microbiology **153**:4098–4110.
- Franki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson, and F. Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol., suppl. 2. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
- Friedrich, A. W., et al. 2006. Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. J. Clin. Microbiol. **44**:1844–1846.
- García-Aljaro, C., et al. 2005. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. FEMS Microbiol. Lett. **246**:55–65.
- García-Aljaro, C., M. Muniesa, J. Jofre, and A. R. Blanch. 2004. Prevalence of the *stx2* gene in coliform populations from aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol. **70**:3535–3540.
- Ge, Z., D. B. Schauer, and J. G. Fox. 2008. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. Cell Microbiol. **10**:1599–1607.
- Guinée, P. A. M., W. H. Jansen, T. Wadström, and R. Sellwood. 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhea in piglets and calves. Curr. Top. Vet. Anim. Sci. **13**:126–162.
- Haghjoo, E., and J. E. Galan. 2004. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**:4614–4619.
- Imamovic, L., E. Ballesté, J. Jofre, and M. Muniesa. 2010. Shiga-toxin converting bacteriophages in wastewater and fecal samples quantified by qPCR. Appl. Environ. Microbiol. **76**:5693–5701.
- Janka, A., et al. 2003. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H– and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. Infect. Immun. **71**:3634–3638.
- Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**:7839–7843.
- Johnson, W. M., and H. Lior. 1987. Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. FEMS Microbiol. Lett. **43**:19–23.

22. **Karch, H., P. I. Tarr, and M. Bielaszewska.** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**:405–418.
23. **Kimmitt, P. T., C. R. Harwood, and M. R. Barer.** 2000. Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:458–465.
24. **Liu, Y., and E. Haggard-Ljungquist.** 1994. Studies of bacteriophage P2 DNA replication: localization of the cleavage site of the A protein. *Nucleic Acids Res.* **22**:5204–5210.
25. **Livny, J., and D. I. Friedman.** 2004. Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Mol. Microbiol.* **51**:1691–1704.
26. **Muniesa, M., et al.** 2004. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1134–1137.
27. **Muniesa, M., and J. Jofre.** 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.
28. **Muniesa, M., et al.** 2004. Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* **150**:2959–2971.
29. **Muniesa, M., J. Recktenwald, M. Bielaszewska, H. Karch, and H. Schmidt.** 2000. Characterization of a Shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* **68**:4850–4855.
30. **Ohara, M., E. Oswald, and M. Sugai.** 2004. Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. *J. Biochem.* **136**:409–413.
31. **Pickett, C. L., and C. A. Whitehouse.** 1999. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol.* **7**:292–297.
32. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
33. **Serra-Moreno, R., J. Jofre, and M. Muniesa.** 2007. Insertion site occupancy by stx<sub>2</sub> bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J. Bacteriol.* **189**:6645–6654.
34. **Serra-Moreno, R., J. Jofre, and M. Muniesa.** 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. *J. Bacteriol.* **190**:4722–4735.
35. **Sinton, L. W., R. K. Finley, and P. A. Lynch.** 1999. Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3605–3613.
36. **Smith, J. L., and D. O. Bayles.** 2006. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **32**:227–248.
37. **Tanji, Y., et al.** 2003. Seasonal change and fate of coliphages infected to *Escherichia coli* O157:H7 in a waste water treatment plant. *Water Res.* **37**:1136–1142.
38. **Thelestam, M., and T. Frisan.** 2004. Cytolethal distending toxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**:111–133.
39. **Tóth, I., F. Hérault, L. Beutin, and E. Oswald.** 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.* **41**:4285–4291.
40. **Tóth, I., et al.** 2009. Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **77**:492–500.
41. **Waldor, M. K., D. I. Friedman, and S. L. Adhya.** 2005. *Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. ASM Press, Washington, DC.
42. **Whitehouse, C. A., et al.** 1998. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G<sub>2</sub>-phase cell cycle block. *Infect. Immun.* **66**:1934–1940.
43. **Zhang, X., et al.** 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J. Infect. Dis.* **181**:664–670.

---

Editor: S. M. Payne





**3.2. Estabilidad e infectividad de bacteriófagos  
Cdt-V en un mesocosmos acuático y bajo  
diferentes condiciones de inactivación**



## **Estabilidad e infectividad de bacteriófagos portadores del gen de la “Cytolethal Distending Toxin” de tipo V en un mesocosmos acuático y bajo diferentes condiciones de inactivación**

**Anna Allué-Guardia**, Juan Jofre y Maite Muniesa\*

\*Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

### Introducción

La toxina Cdt ha sido descrita en varios microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Vibrio* (Okuda *et al.*, 1995), *Helicobacter* (Young *et al.*, 2000), *Campylobacter*, entre otros. El hecho de que *cdt* se encuentre en diferentes géneros bacterianos, así como que no aparezca asociado significativamente a otros factores de virulencia (Martínez-Castillo *et al.*, 2012), sugiere que estos genes son adquiridos por transferencia horizontal a través de fagos. Estos fagos Cdt pueden ser inducidos a partir de la cepa huésped y transmitir el gen de la toxina a otras cepas (Allué-Guardia *et al.*, 2011), causando la aparición de nuevas cepas virulentas. Además de en ambientes clínicos, se han encontrado fagos Cdt en agua residual (Allué-Guardia *et al.*, 2011) y, tal como veremos en este estudio, también en agua de río, hecho que refuerza su potencial papel como transmisores de la toxina en el medio ambiente.

Por tanto, un aspecto importante a tener en cuenta es la persistencia y la estabilidad de estos fagos en las diferentes condiciones ambientales. Por su propia naturaleza, los fagos son mucho más resistentes a ciertos tratamientos de desinfección e inactivación natural que las bacterias huésped (Baggi *et al.*, 2001; Durán *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2011; Muniesa *et al.*, 1999a). Además, se han descrito ciertas morfologías de fagos que permitirían una mayor persistencia a dichos tratamientos (Muniesa *et al.*, 1999b).

### Objetivos y metodología

Por ello, en este estudio, se pretende evaluar la estabilidad de los fagos Cdt bajo diferentes condiciones de temperatura (4°C, 22°C y 37°C), pH (3, 7 y 9), calor (60°C y 70°C, 30 y 60 min), luz UV (1, 5, 10 y 30 min), cloración (1, 3, 5, 10, 20 y 30 min) e inactivación natural (concentración de sales, radiación solar...). Para ello se utilizarán dos fagos Cdt, que serán monitorizados mediante ensayos de infectividad (ufp/ml) y mediante cuantificación de copias genómicas por qPCR. El fago SOM23 (fago ambiental) (Muniesa *et al.*, 2003) se utilizó como control.

Así pues, el objetivo de este trabajo es estudiar la supervivencia de los fagos Cdt tras todos estos tratamientos y así poder evaluar el posible riesgo de estos fagos como potenciales vectores de transmisión del gen de la toxina a otras cepas ambientales, permitiendo la diseminación de *cdt* en el medio ambiente y la aparición de nuevas cepas patógenas.

#### Resultados

Se trabajó con dos fagos Cdt-V, S( $\Phi$ 62) y S( $\Phi$ 125), inducidos a partir de dos lisógenos en *Shigella sonnei* (Allué-Guardia *et al.*, 2011). Tal como se demostró en el capítulo anterior, ambos fagos Cdt presentan inducción espontánea, puesto que no se observaron diferencias significativas en los valores de infectividad o genomas de los lisados fágicos obtenidos a partir de los cultivos tratados con inductores (mitomicina C, UV o EDTA) y los cultivos sin inducir.

Se analizó la estabilidad de los dos fagos Cdt. Se observaron reducciones similares de los dos fagos Cdt y entre los fagos Cdt y el fago control SOM23, que presenta la misma morfología *Siphoviridae* que los fagos Cdt en estudio. Comparando la estabilidad ante la temperatura, a 4°C y 22°C la reducción en infectividad fue de menos de 1 log<sub>10</sub> al cabo de un mes, mientras que a 37°C disminuyó más de 1 log<sub>10</sub>. Los valores de qPCR variaron menos de 1 log<sub>10</sub> a cualquiera de las tres temperaturas. El número de genomas de los fagos Cdt, sin embargo, no disminuyó a lo largo del tiempo.

Referente a la estabilidad de los fagos Cdt frente al pH, los dos fagos perdieron completamente la infectividad al cabo de un día a pH3, del mismo modo se observó para el fago SOM23. A pH7 y 9 los dos fagos estudiados resultaron bastante estables, con reducciones de 1.1 ( $\Phi$ 125) y 0.5 ( $\Phi$ 62) log<sub>10</sub> ufp/ml a pH7 y de 1.6 y 1.7 log<sub>10</sub> ufp/ml a pH9 tras un mes de estudio. De modo similar se redujo el número de ufp del fago control SOM23. Al evaluar los genomas de los fagos Cdt, el número de copias genómicas disminuyó menos de 1 log<sub>10</sub> en todos los casos.

También se estudió la estabilidad de los fagos Cdt y del control SOM23 sometidos a diferentes tratamientos de inactivación (térmico, cloración e inactivación por luz ultravioleta) y lo comparamos con la persistencia de la bacteria huésped *E. coli* cepa 125 (serotipo O157:H7, *stx* y *cdt* positiva). En el tratamiento térmico, la reducción del número de partículas infecciosas a 60°C fue de 1.3 log<sub>10</sub> tanto tras 30 min como tras 60 min para los fagos Cdt y el control SOM23, mientras que a 70°C la inactivación fue mayor de 2.4 log<sub>10</sub> en 30 min y mayor de 4.5 log<sub>10</sub> en 60 min. De nuevo, no hubo diferencias significativas en

los valores de genomas fágicos evaluados mediante qPCR. En cambio, la reducción de la bacteria fue de más de 5 log<sub>10</sub> en las ufc/ml.

Los fagos Cdt, así como el fago control, resultaron ser muy sensibles a los UV, con reducciones en infectividad de hasta 4 log<sub>10</sub> después de 30 min. Los valores de genomas fágicos, de nuevo, no mostraron variaciones significativas. La reducción de ufc/ml de la bacteria fue de más de 5 log<sub>10</sub> tras sólo 5 min de tratamiento. En cuanto a la cloración, los fagos fueron inactivados totalmente tras 30 min, con una disminución de 5 log<sub>10</sub> tras 20 min, mientras que la bacteria disminuyó más de 5 log<sub>10</sub> tras 1 min. El número de CG/ml disminuyeron menos de 1 log<sub>10</sub> en todos los casos.

Para la inactivación natural, los fagos se pusieron en membranas de diálisis y se sumergieron en un estanque, con agua natural no clorada, a diez centímetros de la superficie, donde actúan diferentes factores ambientales, entre ellos la temperatura y la insolación. La inactivación presentada por todos los microorganismos estudiados fue mayor en verano que en invierno en todos los casos, siendo la inactivación de la bacteria mucho mayor que la de los fagos. Las variaciones en los valores de genomas fágicos de fagos Cdt tras el tiempo de inactivación no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, en vista de la persistencia mostrada por los fagos Cdt frente a diversos tratamientos, se procedió a la cuantificación del número de fagos Cdt en muestras de río, dado que presenta unos niveles de contaminación fecal menores que las muestras de agua residual analizadas en el estudio anterior. El 72.7% de las muestras resultaron positivas, confirmando la presencia de los fagos Cdt circulando por el medio ambiente, en el caso de muestras con contaminación fecal moderada y sometida a cierto grado de inactivación.

### Discusión

Como se ha visto, los fagos Cdt-V estudiados son de inducción espontánea ya que no se observa un aumento de estos fagos tras el tratamiento con agentes inductores. En esto, los fagos de nuestro estudio son diferentes al fago Cdt-I, descrito anteriormente, que aparentemente requiere mitomicina C para activar el ciclo lítico (Asakura *et al.*, 2007). Esta auto-inducción, o inducción espontánea en ausencia de agente inductor sugiere que posiblemente estos fagos presentan una mayor difusión y distribución en el medio ambiente puesto que pueden originarse a partir de las cepas huésped de forma espontánea.

Como potenciales vectores para la transmisión del gen *cdt*, es importante estudiar la estabilidad de los fagos Cdt bajo diferentes condiciones ambientales y su persistencia frente a tratamientos de desinfección. En este estudio se compara los valores de fagos infecciosos y los valores de genomas de fago. Hay que destacar que los valores de genomas no necesariamente se correlacionan con el número de partículas infecciosas, que son las potencialmente peligrosas para la transmisión de la toxina. En nuestro estudio, bajo los diferentes tratamientos, la reducción de genomas fágicos es mucho menor que la presentada por las partículas infecciosas.

Los fagos Cdt mostraron una gran estabilidad a diferentes temperaturas y pHs, excepto en el caso de pH ácido, donde se inactivaron en un día, a diferencia de otros fagos que resisten en ambientes más ácidos (Jończyk *et al.*, 2011). En cuanto a los tratamientos de inactivación utilizados, en todos los casos se comprobó que las bacterias se inactivan con mayor rapidez que los fagos, sugiriendo así que los fagos pueden actuar mejor como reservorio ambiental del gen *cdt*. Los valores de inactivación de los fagos Cdt fueron muy similares a los del fago control SOM23, que también presenta una morfología *Siphoviridae*, descrita como una de las más resistentes ante los tratamientos aplicados en este estudio (Durán, *et al.*, 2002; Lee y Sobsey, 2011; Muniesa *et al.*, 1999b) y los resultados concuerdan con estudios anteriores hechos con otros fagos de *E. coli* (Cunault *et al.*, 2011; Dee y Fogleman, 1992).

La cloración, comúnmente usada para el tratamiento del agua de bebida, eliminaría completamente las bacterias en poco tiempo, aunque la presencia de los fagos, y más específicamente fagos infecciosos, que aún pueden ser detectados tras 20 minutos de tratamiento, supone un problema potencial, así como la detección de estos fagos tras el tratamiento con luz ultravioleta y tratamiento térmico.

La inactivación natural permitió la evaluación de diferentes factores ambientales de manera simultánea. Probablemente, en nuestro estudio la inactivación que se observó fue debida a la radiación solar (Davies-Colley *et al.*, 1999) y en menor medida a la temperatura, puesto que el resto de variables (pH o concentración de sales) se mantuvieron bastante estables a lo largo del experimento y la temperatura parecía no afectar demasiado a la estabilidad de los fagos (tal y como habíamos visto en los experimentos anteriores).

Dadas las evidencias de que los fagos Cdt circulan libremente en el ambiente, y de su elevada persistencia, se reafirman como potenciales vectores para la transmisión de toxinas. Esto puede provocar la aparición de nuevas cepas con el gen Cdt y/o variantes más

virulentas. Por ello, es importante saber más acerca de la inducción y la diseminación de estos fagos en el medio ambiente.

#### Informe del factor de impacto

El artículo titulado “**Stability and Infectivity of Cytolethal Distending Toxin Type V Gene-Carrying Bacteriophages in a Water Mesocosm and Under Different Inactivation Conditions**” fue publicado en agosto de 2012 en la revista *Applied and Environmental Microbiology* 78(16):5818-5823, que tuvo un factor de impacto de 3,678 para el año 2012 y que pertenece al primer cuartil de la categoría Biotecnología y Microbiología Aplicada.

#### Informe de coautoría

La doctoranda realizó los procedimientos experimentales (ensayos de inducción, tratamientos de inactivación, estudio de la estabilidad, ensayos de qPCR, etc) y participó en la redacción del artículo y el diseño de las figuras.





# Stability and Infectivity of Cytolethal Distending Toxin Type V Gene-Carrying Bacteriophages in a Water Mesocosm and under Different Inactivation Conditions

Anna Allué-Guardia, Juan Jofre, and Maite Muniesa

Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Two cytolethal distending toxin (Cdt) type V-encoding bacteriophages ( $\Phi 62$  and  $\Phi 125$ ) were induced spontaneously from their wild-type *Escherichia coli* strains and from the lysogens generated in *Shigella sonnei*. The stability of Cdt phages was determined at various temperatures and pH values after 1 month of storage by means of infectivity tests using a plaque blot assay and analysis of phage genomes using real-time quantitative PCR (qPCR): both were highly stable. We assessed the inactivation of Cdt phages by thermal treatment, chlorination, UV radiation, and in a mesocosm in both summer and winter. The results for the two Cdt phages showed similar trends and were also similar to the phage SOM23 used for reference, but they showed a much higher persistence than Cdt-producing *E. coli*. Cdt phages showed maximal inactivation after 1 h at 70°C, 30 min of UV radiation, and 30 min of contact with a 10-ppm chlorine treatment. Inactivation in a mesocosm was higher in summer than in winter, probably because of solar radiation. The treatments reduced the number of infectious phages but did not have a significant effect on the Cdt phage particles detected by qPCR. Cdt phages were quantified by qPCR in 73% of river samples, and these results suggest that Cdt phages are a genetic vehicle and the natural reservoir for *cdt* in the environment.

Cytolethal distending toxin (Cdt) is produced by different pathogenic microorganisms, including *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* (29), and *Campylobacter* spp. (18), among others (15, 22, 33). Its cytolethal distending action consists of blocking the G<sub>2</sub> and M phases during mitosis, which distends the cells, since cell division ceases but growth continues.

Cdt consists of three subunits (CdtA, CdtB, and CdtC) that are encoded by three adjacent genes. The catalytic subunit CdtB is homologous to DNase I and is the most conserved gene due to its essential role in cellular toxicity. The other subunits act as binding proteins that deliver CdtB into target cells, thus producing the cytotoxic effect (13). Five variants of the toxin have been reported in *E. coli*. In some of these variants, the *cdt* genes are flanked by lambda-like and bacteriophage P2 genes (Cdt-I and Cdt-IV) (32). Some variants are present in inducible lambdoid prophages, such as Cdt-I (5) and Cdt-V (2), or are encoded in pVir, a conjugative plasmid (Cdt-III) (30).

Recent genomic sequencing of different *E. coli* strains indicates that a large part of the genome consists of bacteriophage genes and that they constitute an important mechanism for adaptation to new hosts through the horizontal transfer of virulence genes (7). Cdt genes in *E. coli* occur independently of the presence of other virulence traits (21), which strongly suggests that they are independently acquired by horizontal gene transfer, probably by means of bacteriophages. *cdt* can be transduced from a *cdt*-positive bacteria to a *cdt*-negative strain by means of bacteriophages (2, 5). This is an important process because this gene exchange can lead to the emergence of virulent strains. Cdt-V phages have been detected in fecally polluted wastewater (2), which suggests a certain prevalence of these phages in the environment and reinforces the hypothesis that they mobilize *cdt*. Therefore, an important aspect to be considered is the survival and persistence of these phages in different environmental conditions, since this will affect the dissemination of *cdt* genes.

Bacteriophages show a higher resistance to natural and anthro-

pogenic external stress factors than bacteria (6, 12, 20, 25, 26). Within the different phage groups, it seems that particular morphologies could lead to improved survival of bacteriophages in certain conditions (25, 26). Cdt phages belongs to the *Siphoviridae* morphology; tailored phages which, according to some authors, are very stable under different conditions (1, 20, 26). In the present study, we evaluated the infectivity and stability of Cdt phages in different external conditions using infectivity assays and a real-time quantitative PCR (qPCR) method, to establish their persistence in the environment.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, bacteriophages, and media.** Lysates of Cdt-V-encoding bacteriophages  $\Phi 62$  and  $\Phi 125$ , initially isolated from wild-type *E. coli* strain 62 (serotype O22:H8) and *E. coli* strain 125 (serotype O157:H7) were obtained from *S. sonnei* lysogens as described elsewhere (2). The bacteriophage SOM23, an environmental isolate belonging to the *Siphoviridae* morphology (27), was used as an *E. coli* phage control. *E. coli* strain 125 (*cdt*+) (2) was used as a bacterial control. *S. sonnei* strain 866 was used as the host strain. Luria-Bertani (LB) broth, LB agar, Trypticase soy agar (TSA), and ChromoCult Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Germany) were used to culture the bacteria. Mitomycin C (0.5, 2, and 5  $\mu$ g/ml) and EDTA (20 mM) were added to the lysogens to induce Cdt phages.

**Isolation of phage DNA, PCR studies, and sequencing.** Phage DNA was isolated from the phage lysates and from 100-ml samples of river water as previously described (2). For phage DNA isolation from lysis plaques, each plaque was recovered from the agar layer using a sterile loop, suspended in 100  $\mu$ l of phosphate-buffered saline, and treated with

Received 27 March 2012 Accepted 1 June 2012

Published ahead of print 8 June 2012

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

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00997-12

DNase, and, after heat inactivation of DNase (15 min at 95°C), the sample was processed for DNA extraction. Conventional PCRs, real-time qPCR assays for Cdt-V detection, and sequencing of PCR products were performed using protocols and primers previously described (2).

**Infectivity of Cdt phages and plaque blot hybridization.** Cdt phages were enumerated by the double agar layer method using *S. sonnei* strain 866 as the host strain (2). Those plates of Cdt phages containing approximately 100 to 300 PFU were transferred to a nylon membrane and hybridized with the digoxigenin-labeled *cdt*-B-V specific probe as previously described (2).

**Stability at different temperatures and at different pH.** Aliquots of phage lysates containing  $10^3$  to  $10^4$  PFU of Cdt phages/ml and  $10^6$  PFU of SOM23/ml were placed in 50-ml tubes and incubated at 4, 22, and 37°C. For pH assays, the medium was adjusted to pH 3, 7, and 9 and confirmed before each sampling interval. Tubes were incubated for 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days. Infectious Cdt phages and Cdt phage particles were determined at each interval.

**Inactivation experiments.** Aliquots of phage lysates containing approximately  $10^4$  to  $10^5$  PFU of Cdt phages/ml,  $10^4$  to  $10^6$  PFU of SOM23/ml, and  $10^5$  to  $10^6$  CFU of Cdt-STEC strain 125/ml were used for the inactivation experiments. For thermal treatment, the phages and bacteria were placed into a water bath at 60 and 70°C. The samples were removed after 30 and 60 min. As a source of UV radiation, an 8-W germicidal lamp that emitted monochromatic UV radiation at 253.7 nm (G8T5.2N; San-kyo Denk, Tokyo, Japan) was used (31). Samples (5 ml) were placed 5 cm from the lamp in sterile petri dishes (90 mm in diameter) and irradiated for 1, 5, 10, and 30 min.

For chlorine inactivation, phage lysates and bacteria were diluted 1:20 in double-distilled water, treated with 10-ppm chlorine supplied as sodium hypochlorite, and incubated for 1, 3, 5, 10, 20, and 30 min at room temperature (21°C). Residual chlorine was neutralized by adding 3% (wt/vol) sodium thiosulfate (12).

To assay inactivation in a mesocosm, phage lysates and bacterial cultures were diluted 1:10 in the well water used for these experiments. Suspensions containing phages or bacteria were placed into dialysis tubes (cutoff, 14 kDa), which were sealed and placed in an outdoor pond with a water volume of 60 m<sup>3</sup>, protected by a cage, at a depth of 20 cm. The pond was supplied with nonchlorinated water from a well and provided a habitat for some species of goldfish. The experiments were performed in July (temperature, 18.5 to 24°C; solar radiation, 23 MJ m<sup>-2</sup>) and January (temperature, 7 to 14°C; solar radiation, 8.5 MJ m<sup>-2</sup>). The pH (6.8) and turbidity (4.1 to 6.8 nephelometric turbidity units [NTUs]) were stable throughout the year. The tubes containing the phage lysates were sampled at various intervals and analyzed.

**Analysis of water from the Llobregat River.** Aerobic bacteria were evaluated in TSA at 37°C for 18 h. *E. coli* was determined with the membrane filtration method (3). Somatic coliphages, proposed as suitable indicators of viral fecal pollution, were enumerated by using the ISO method (4). Cdt phages were isolated from 100 ml of the sample and evaluated using real-time qPCR.

**Data analysis and statistics.** For each experiment, a linear regression of the values was calculated between the intervals containing measurable data (above the limit of detection), and the regression equation was generated using Excel software (Microsoft Excel 2010). The results present the average of the three regression-line slopes and their corresponding standard deviations for the data obtained in the three independent replicates of each experiment.

## RESULTS

**Induction of Cdt-V phages.** The two Cdt-V phages used in the present study were obtained from *E. coli* wild-type strains and from *S. sonnei* lysogens S(Φ62) and S(Φ125) (2). We confirmed that these phages were spontaneously induced from their respective lysogens, since no significant ( $P > 0.05$ ) differences were observed in phage determinations (infectivity assays or qPCR) when

using mitomycin C (0.5, 2, and 5 μg/ml), EDTA, or UV induction compared to the noninduced cultures. Since Cdt phages are known to carry only one *cdt* copy (5), the *cdt* gene copy (GC) values can be extrapolated to give the number of Cdt phages in each sample.

**Stability of Cdt phages.** Cdt phages, obtained from lysogens without an inducing agent, were evaluated for infectivity (plaque assay and hybridization) and using real-time qPCR. The presence of *cdt*-V in two to five plaques positive by hybridization was further confirmed by conventional PCR and sequencing.

Similar reductions were observed over time for both Cdt phages and SOM23 (Fig. 1A). Storage at 4 and 22°C showed inactivation of  $<1 \log_{10}$  units after 1 month of storage, and there were no significant differences between the temperatures (Student *t* test,  $P > 0.05$ ). Phages showed less stability at 37°C and decreased more than 1  $\log_{10}$  unit after 1 month. qPCR showed a  $<1\text{-}\log_{10}$  reduction in GC at the three temperatures after 1 month.

Stability at different pH values was evaluated at 4°C, since that temperature showed the lowest reduction in the number of infectious Cdt phages. When exposed to low pH (pH 3), all three phages lost their infectivity after only 1 day, and no plaques were observed; hence, pH 3 is not presented in the chart (Fig. 1B). Cdt phages presented remarkable stability at pH 7 and 9. At pH 7, the phages maintained their infectivity throughout the month, with inactivation at day 28 of only 1.1 (Φ125) and 0.5 (Φ62)  $\log_{10}$  PFU/ml. Stability was also observed at pH 9, with reductions of only 1.6 and 1.7  $\log_{10}$  PFU/ml after 1 month (Fig. 1B). The qPCR reflected the stability at different pH with reductions of  $<1 \log_{10}$  GC/ml after 1 month.

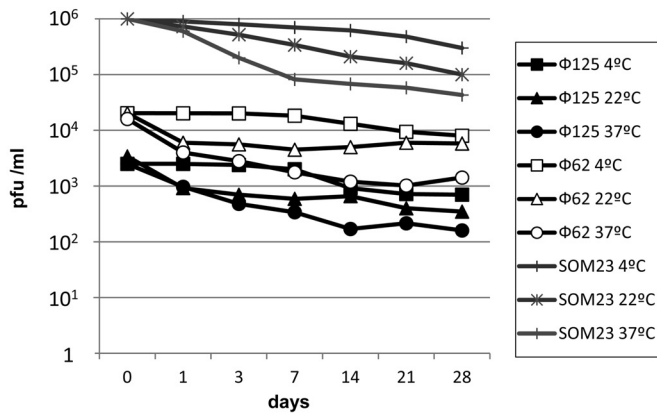
**Inactivation treatments.** The resistance of the two Cdt phages and SOM23 to high temperatures (60 and 70°C) showed similar trends. When treated at 60°C, inactivation of infectious particles was of 1.3  $\log_{10}$  units at 60 min, whereas treatment at 70°C showed inactivation greater than 2.4  $\log_{10}$  units at 30 min and greater than 4.5  $\log_{10}$  units at 60 min. Cdt phage particles were still detectable by qPCR (Fig. 2A), and there was no remarkable reduction at any time interval or temperature, which confirms that the phage DNA remained intact. In contrast, a drastic reduction of 5  $\log_{10}$  units of CFU of *E. coli* strain 125 (Cdt-STEC) was observed after treatment at 60°C for 30 min.

Although the UV inactivation approach used does not allow calculation of the UV dose applied, it allows comparison between microorganisms. Cdt phages were very sensitive to the UV treatment used and showed reductions of infectious phages of 3.5 (Φ125), 3.1 (Φ62), and 4.0 (SOM23)  $\log_{10}$  units after 30 min, but they were still more resistant than the Cdt-STEC strain (Fig. 2B), which showed a reduction of 5  $\log_{10}$  units after only 5 min. However, qPCR showed Cdt phage particles were not affected by the UV treatment, and GC did not decrease significantly (Student *t* test,  $P > 0.05$ ).

Chlorination completely inactivated all parameters after 30 min of contact (Fig. 2C). However, Cdt phages took more than 20 min to decrease by 5  $\log_{10}$  units compared to 1 min for Cdt-STEC. Nevertheless, the strongest inactivation of phages was observed after 1 min of contact. qPCR values of GC/ml showed inactivation below 1  $\log_{10}$  unit after 30 min.

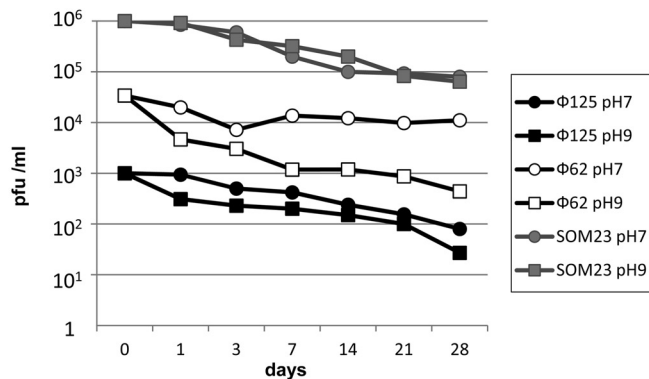
The inactivation of Cdt phages, SOM23, and Cdt-STEC in a mesocosm varied with season (Fig. 3). All of the microorganisms inactivated significantly faster (Student *t* test,  $P < 0.05$ ) in summer than in winter. Inactivation of Cdt-STEC was faster than that

## A: Temperature



	Temperature	Infectivity	qPCR
Φ125	4°C	-0.11 (0.05)	-0.06 (0.01)
	22°C	-0.13 (0.07)	-0.14 (0.00)
	37°C	-0.19 (0.05)	-0.10 (0.02)
Φ62	4°C	-0.07 (0.02)	-0.06 (0.00)
	22°C	-0.06 (0.01)	-0.06 (0.00)
	37°C	-0.17 (0.10)	-0.15 (0.03)
SOM23	4°C	-0.08 (0.00)	-
	22°C	-0.16 (0.08)	-
	37°C	-0.23 (0.10)	-

## B: pH



	pH	Infectivity	qPCR
Φ125	pH 3	-	-0.18 (0.00)
	pH 7	-0.18 (0.09)	-0.15 (0.00)
	pH 9	-0.21 (0.12)	-0.19 (0.03)
Φ62	pH 3	-	-0.19 (0.04)
	pH 7	-0.07 (0.01)	-0.11 (0.09)
	pH 9	-0.27 (0.08)	-0.18 (0.05)
SOM23	pH 3	-	-
	pH 7	-0.21 (0.02)	-
	pH 9	-0.21 (0.03)	-

FIG 1 Stability of Cdt phages and SOM23 at various temperatures (4, 22, and 37°C) (A) and different pHs (3, 7, and 9 after 1 month of storage at 4°C) (B). The results of infectivity presented (PFU/ml) for Φ62 and Φ125 correspond to plaque blot hybridization results. Infectivity of phage SOM23 was evaluated using plaque assays, which was included as a control. The charts show the results of one representative experiment. The tables present the averages (with the standard deviations [SD] indicated in parentheses) of the slopes of the logarithmic regression lines obtained in three replicas of each experiment for infectious phages and qPCR.

of Cdt phages, whose inactivation was 2.7 and 2.2  $\log_{10}$  units for Φ125 and Φ62, respectively, in summer and 1.9  $\log_{10}$  units for both in winter. These inactivation values were similar to those of the control phage SOM23. qPCR values for both Cdt phages showed a very small reduction (Fig. 3) below 0.6  $\log_{10}$  units throughout the experiment in summer and below 0.4  $\log_{10}$  units in winter.

**Quantification of free Cdt phages in samples from the Llobregat River.** Eleven river-water samples were collected from the Llobregat River, a watercourse that receives mostly human fecal pollution. The samples showed fecal contaminants 4  $\log_{10}$  units below the levels present in wastewater samples from the same area (Table 1) (2). Cdt phages were detected by qPCR in 72.7% of river samples, which confirmed the circulation of Cdt phages in the environment.

## DISCUSSION

The induction of Cdt phages in the present study does not seem to be stimulated by any inducing agent such as mitomycin C, UV light, or EDTA (16, 24, 28), in contrast to the behavior of the Cdt-I phage (5), which is induced by mitomycin C. Spontaneous induction of Cdt phages suggests that the diffusion of induced Cdt

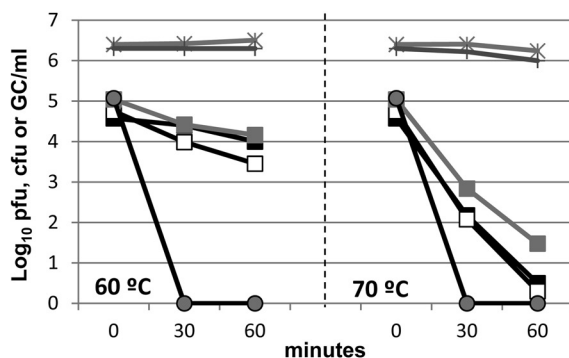
phages should be greater than for those phages that require specific conditions for their induction.

In previous work, Cdt phages were detected in wastewater samples (2), revealing the environmental presence of these phages released directly from the gut or induced from Cdt-positive bacteria. Here, Cdt phages were detected in 72.7% of river samples with lower levels of contamination than wastewater and primarily affected by human waste, indicating that the Cdt phages detected probably had an anthropogenic source. The potential capacity of Cdt phages to transduce *cdt* is a cause for some concern because of the potential conversion of nonlysogenic strains to Cdt-producing ones. Evaluating the persistence of Cdt phages in extraintestinal environments is necessary to provide insight into the spread and mobilization of *cdt* in the environment.

The persistence of Cdt phages was evaluated by qPCR, as well as by phage infectivity. The qPCR results do not necessarily correlate with infectivity of phages, which is essential for potential *cdt* transduction. Hybridization was also necessary for an accurate enumeration of Cdt-positive plaques, to discriminate them from other phages (for instance Stx phages) that may have been present in the phage lysates (2).

Cdt phages remain stable after 1 month of storage at various

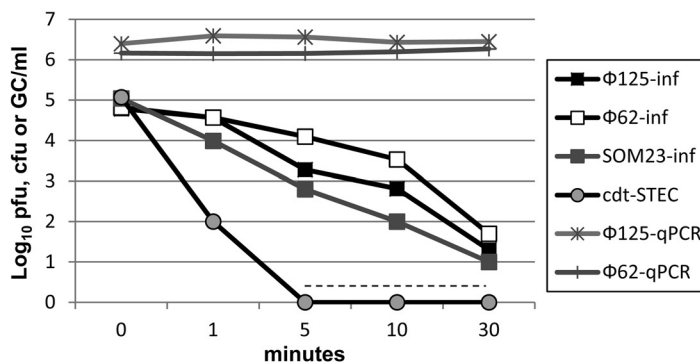
## A: Thermal treatment



	Infectivity		qPCR	
	60°C	70°C	60°C	70°C
<b>Φ125</b>	-0.29 (0.02)	-2.04 (0.24)	0.00 (0.00)	-0.02 (0.00)
<b>Φ62</b>	-0.65 (0.10)	-2.22 (0.39)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
<b>SOM23</b>	-0.44 (0.19)	-1.78 (0.29)	-	-
<b>Cdt-STECl</b>	-5.07* (0.22)	-5.07* (0.10)	-	-

\* Calculated from 0-30 min.

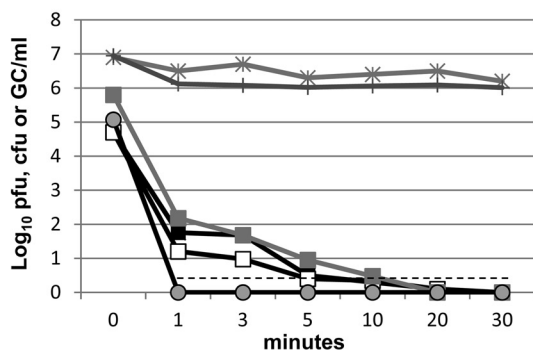
## B: UV inactivation



	Infectivity		qPCR	
<b>Φ125</b>	-0.87	(0.15)	-0.01	(0.00)
<b>Φ62</b>	-0.72	(0.18)	-0.00	(0.00)
<b>SOM23</b>	-1.00	(0.20)	-	-
<b>Cdt-STECl</b>	-2.53*	(0.38)	-	-

\* Calculated from 0-5 min.

## C: Chlorine inactivation



	Infectivity		qPCR	
<b>Φ125</b>	-0.81*	(0.15)	-0.09	(0.00)
<b>Φ62</b>	-0.74*	(0.20)	-0.11	(0.00)
<b>SOM23</b>	-0.99*	(0.33)	-	-
<b>Cdt-STECl</b>	-5.07*	(0.22)	-	-

\* Calculated from 0-20 min. for phages and from 0-1 min. for Cdt-STECl

FIG 2 Persistence of Cdt phages Φ62 and Φ125, SOM23, and Cdt-STECl under thermal treatment at 60 and 70°C (A) to UV treatment (B) to 10 ppm of chlorine (C) through time. The charts on the left show logarithmic values of PFU, CFU or GC/ml. The tables on the right present the averages (SD) of the slopes of the logarithmic regression lines obtained in three replicates of each experiment. Dotted lines indicate values below the limit of detection.

temperatures and pH values. Temperature determines the occurrence and viability of the phages in different environments. In terms of pH, some phages persist well in acidic environments (19), but this is not the case for Cdt phages, which lose their infectivity when stored for 1 day at pH 3. In contrast, Cdt phages retain their infectivity better at pH 7 and 9, which is in line with reports of λ phage (17).

When assaying different inactivation conditions, there was a clear gradation in resistance, with bacteria being much more susceptible to inactivation than phages, as extensively reported for other phages (9, 12, 25, 26). Assuming that the natural host of Cdt-V phages is *E. coli*, their higher stability suggests that phages are the natural reservoir of *cdt* in the environment. Inactivation of

Cdt phages showed similar trends to that of SOM23. This may be due to the fact that it is a tailored phage, which has been described as highly stable under different conditions (1, 11, 20). The results for Cdt phage inactivation were also in agreement with reports on other *E. coli* phages, either for thermal treatment (8, 20, 23), UV treatment (20, 31), or chlorination (10, 12, 26). Chlorinating water with 10 ppm of chlorine would provide water with no bacteria, which would be considered suitable for consumption according to current practices in many parts of the world. However, Cdt phages may still be detected in the chlorinated samples.

Inactivation of phages in a mesocosm provides the simultaneous analysis of different factors, except probably for the effect of grazing. However, protozoa grazing seems to be restricted to



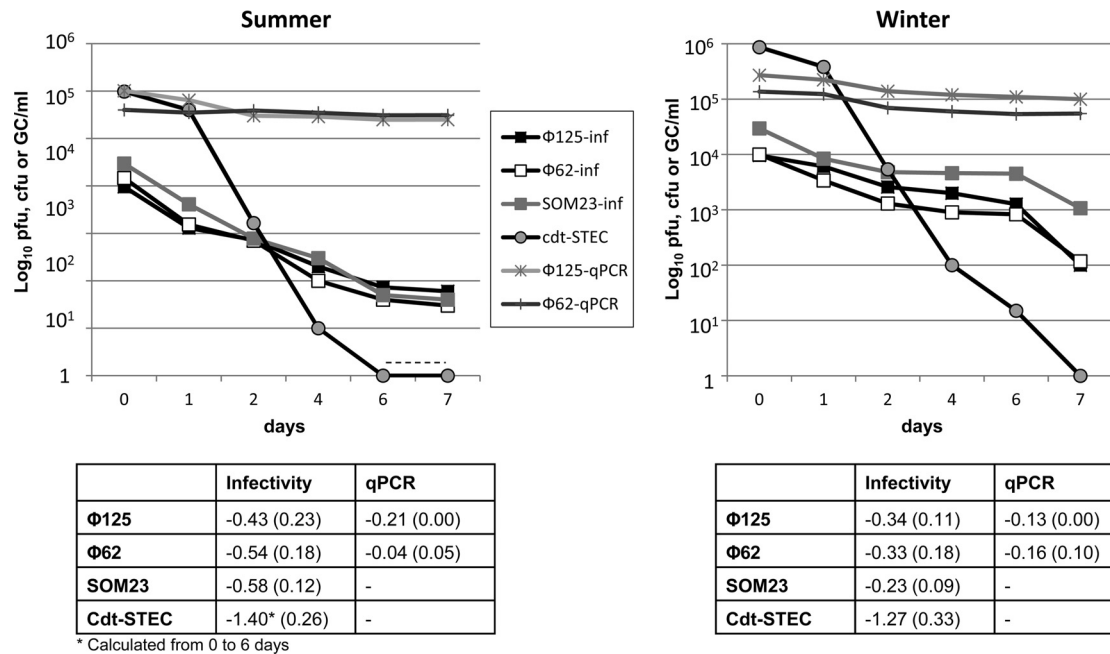


FIG 3 Persistence of Cdt phages (qPCR and infectivity), SOM23 (plaque assay) and Cdt-STEC (colony counts) to inactivation processes in a mesocosm in summer and winter. Each chart shows the results of one representative experiment in each season. The table presents the averages (SD) of the slopes of the equation of the logarithmic regression lines obtained with three replicas of the experiment. The dotted line indicates values below the limit of detection.

larger microorganisms than viruses, and the effect of grazing on phage numbers is not clear (14). It is difficult to determine which factor is the main cause of inactivation, although a detailed analysis may provide some insight. The pond did not experience pH variations during the experiment. In summer, all of the microorganisms were inactivated faster than in winter. The main differences in the physical factors between summer and winter were temperature and solar irradiation. The low inactivation of Cdt phages at similar temperatures, especially after 7 days, suggests that irradiation is the differential factor for the inactivation of Cdt phages in the mesocosm. Although our UV experiments cannot be compared to solar UV doses, UV light is a recognized inactivating factor (9, 11, 25).

Bacteriophages are an important source of new genetic variants. It is important to find out more about the induction and dissemination of extraintestinal phages in order to control the emergence of new pathogenic strains. The persistence shown by Cdt phages indicates that they spread in the environment and act as mobile vehicles of *cdt*, as observed previously for

other bacteriophages harboring virulence genes, such as Shiga toxin phages (25).

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2009-07576), the Xarxa de Referència en Biotecnologia, and the bacteriophage network FAGOMA. A.A.-G. has an FI grant from the Generalitat de Catalunya (Spain).

#### REFERENCES

- Ackermann HW, Tremblay D, Moineau S. 2004. Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newsl.* 38:35–40.
- Allué-Guardia A, García-Aljaro C, Muniesa M. 2011. Bacteriophage-encoding cytolethal distending toxin type V gene induced from nonclinical *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.* 79:3262–3272.
- Anonymous. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, American Works Association and Water Environmental Federation, Washington, DC.
- Anonymous. 2000. ISO 10705-2: water quality: detection and enumeration of bacteriophages. 2. Enumeration of somatic coliphages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Asakura M, et al. 2007. An inducible lambdaoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:14483–14488.
- Baggi F, Demarta A, Peduzzi R. 2001. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Res. Microbiol.* 152:743–751.
- Boyd EF, Brüssow H. 2002. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.* 10:521–529.
- Cunault C, Pourcher AM, Burton CH. 2011. Using temperature and time criteria to control the effectiveness of continuous thermal sanitation of piggery effluent in terms of set microbial indicators. *J. Appl. Microbiol.* 111:1492–1504.

TABLE 1 Cdt phages detection in Llobregat River water

Sample ( <i>n</i> = 11) parameter	Bacterial indicators		Bacteriophages	
	Aerobic bacteria (CFU/100 ml)	<i>E. coli</i> (CFU/100 ml)	Somatic coliphages (PFU/100 ml)	Cdt phages (GC/100 ml) <sup>a</sup>
% Positive	100	100	100	72.7
No.				
Avg	$5.13 \times 10^5$	$1.65 \times 10^3$	$2.63 \times 10^4$	$1.14 \times 10^1$
Max	$6.32 \times 10^5$	$5.21 \times 10^3$	$5.51 \times 10^4$	$1.9 \times 10^1$
Min	$1.93 \times 10^4$	$9.30 \times 10^2$	$1.02 \times 10^4$	$6.50 \times 10^0$

<sup>a</sup> GC, gene copies.

9. Davies-Colley RJ, Donnison AM, Speed DJ, Ross CM, Nagels JW. 1999. Inactivation of faecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Res.* 33:1220–1230.
10. Dee SW, Fogelman JC. 1992. Rates of inactivation of waterborne coliphages by monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3136–3141.
11. Durán AE, et al. 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* 92:338–347.
12. Durán AE, et al. 2003. Usefulness of different groups of bacteriophages as model microorganisms for evaluating chlorination. *J. Appl. Microbiol.* 95:29–37.
13. Ge Z, Schauer DB, Fox JG. 2008. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol.* 10:1599–1607.
14. Gonzalez JM, Sherr EB, Sherr BF. 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:583–589.
15. Haghjoo E, Galan JE. 2004. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:4614–4619.
16. Imamovic L, Muniesa M. 2012. Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS One* 7:e32393. doi:10.1371/journal.pone.0032393.
17. Jepson CD, March JB. 2004. Bacteriophage lambda is highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine* 22:3413–3419.
18. Johnson WM, Lior H. 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* 4:115–126.
19. Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. 2011. The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiol. (Praha)* 56: 191–200.
20. Lee HS, Sobsey MD. 2011. Survival of prototype strains of somatic coliphage families in environmental waters and when exposed to UV low-pressure monochromatic radiation or heat. *Water Res.* 45:3723–3734.
21. Martínez-Castillo A, et al. 2012. Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater. *Environ. Microbiol. Rep.* 4:147–155.
22. Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ, DiRienzo JM. 1999. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 67:1227–1237.
23. Mocé-Llivina L, Muniesa M, Pimenta-Vale H, Lucena F, Jofre J. 2003. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1452–1456.
24. Mühldorfer I, et al. 1996. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 64:495–502.
25. 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.
26. Muniesa M, Lucena F, Jofre J. 1999. Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *J. Appl. Microbiol.* 87:402–409.
27. Muniesa M, Mocé-Llivina L, Katayama H, Jofre J. 2003. Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83:305–315.
28. Mustard JA, Little JW. 2000. Analysis of *Escherichia coli* RecA interactions with LexA,  $\lambda$  CI, and UmuD by site-directed mutagenesis of *recA*. *J. Bacteriol.* 182:1659–1670.
29. Okuda J, Kurazono H, Takeda Y. 1995. Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio* and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb. Pathog.* 18:167–172.
30. Smith JL, Bayles DO. 2006. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* 32:227–248.
31. Tartera C, Bosch A, Jofre J. 1988. The inactivation of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* by chlorine treatment and UV-irradiation. *FEMS Microbiology Lett.* 56:313–316.
32. Tóth I, et al. 2009. Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 77:492–500.
33. Young VB, et al. 2000. Cytolethal distending toxin in avian and human isolates of *Helicobacter pullorum*. *J. Infect. Dis.* 182:620–623.

### **3.3. Persistencia de bacteriófagos Stx infectivos tras diferentes tratamientos de desinfección**





## **Persistencia de bacteriófagos Stx infectivos tras diferentes tratamientos de desinfección**

**Anna Allué Guardia**, Alexandre Martínez Castillo, y Maite Muniesa\*

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Diagonal 643, Anexo, Planta 0, 08028 Barcelona, España

### Introducción

Las STEC o *E. coli* productoras de toxina Shiga constituyen un grupo importante de *E. coli* patógenas causantes de diversas enfermedades, desde diarrea que puede derivar a diarrea hemorrágica, hasta complicaciones de estas infecciones que incluyen el síndrome hemolítico urémico (HUS) (Erickson y Doyle, 2007; Melton-Celsa *et al.*, 2012) o la púrpura trombótica trombocitopénica (Noris *et al.*, 2012). Las cepas STEC se caracterizan por la producción de dos tipos de toxinas, la toxina Shiga 1 (Stx1) y la toxina Shiga 2 (Stx2), que presentan numerosas variantes, siendo la Stx2 más asociada a las cepas más virulentas y a complicaciones más severas de la enfermedad.

Las toxinas Stx están codificadas por los genes *stx*, que se localizan en el genoma de fagos atemperados, los fagos Stx. Estos fagos son muy diversos en cuanto a su estructura genética y morfología (Herold *et al.*, 2004). Al tratarse de fagos atemperados, su ciclo lítico puede ser activado, causando una multiplicación del genoma del fago y, como consecuencia, una mayor producción de la toxina. Tras la activación del ciclo lítico del fago, se produce una lisis de la célula huésped, lo que causa una liberación de partículas fágicas al exterior de la célula bacteriana, cosa que facilitaría la diseminación de los fagos Stx en el medio ambiente. Consecuentemente, se han aislado fagos Stx en muestras de heces de individuos sanos (Martínez-Castillo, *et al.*, 2013) y agua con contaminación fecal de origen humano y animal (Muniesa *et al.*, 1999a; Dumke *et al.*, 2006; Imamovic *et al.*, 2010), así como en muestras de alimentos, que presentan niveles de indicadores microbianos que las hacen aceptables para el consumo humano (Imamovic y Muniesa, 2011).

La presencia de los fagos Stx en el medio ambiente implica que éstos deben ser capaces de persistir bajo diferentes condiciones que pudieran inactivarlos. Los nuevos métodos de cuantificación por qPCR específica para los fagos Stx (Imamovic *et al.*, 2010), así como la optimización de protocolos para la detección de fagos Stx infectivos o

para detectar la generación de lisógenos, permiten obtener mejores datos cuantitativos sobre la estabilidad de estos fagos en el medio ambiente.

#### Objetivos y metodología

El objetivo de este capítulo es estudiar la persistencia de fagos Stx (mediante ensayos de infectividad y cuantificación por qPCR) bajo diferentes condiciones y tratamientos de inactivación: temperatura (4°C, 22°C y 37°C), pH (3, 7 y 9), radiación UV (1, 5, 10 y 30 min), cloración (1, 3, 5, 10 y 20 min a 10ppm), calor (60°C y 70°C, 30 y 60 min) e inactivación natural en un mesocosmos. Otro de los objetivos de este capítulo es comprobar si los fagos Stx siguen siendo infectivos después de estos tratamientos y si son capaces de transducir el gen de la toxina a otras cepas, cosa que representaría un peligro potencial debido a la aparición de nuevas cepas virulentas productoras de toxina Shiga.

#### Resultados

A partir de dos lisógenos de laboratorio, y mediante inducción con mitomicina C, se obtuvieron dos fagos Stx,  $\Phi 534$  y  $\Phi 557$ , que presentaban una morfología *Podoviridae* (Franki *et al.*, 1991) y una estabilidad muy similar. Se evaluó la persistencia de ambos fagos (genomas fágicos y fagos infecciosos) incubados a diferentes temperaturas. Ambos fagos presentaron una inactivación menor de  $1.5 \log_{10}$  ufp/ml cuando se los mantuvo a 4°C durante un mes y de  $2.2 \log_{10}$  a 22°C tras un mes de incubación. A 37°C, en cambio, la disminución en el título de fagos infecciosos fue de más de  $4 \log_{10}$ . Los resultados de qPCR, que mostraban la inactivación de genomas fágicos, mostraron una reducción de menos de  $1 \log_{10}$  en el número de CG de *stx* en ADN fágico a cualquiera de las tres temperaturas analizadas después de un mes.

Respecto al pH, los dos fagos perdieron completamente la infectividad tras un día a pH3, mientras que a pH7 y pH9 fueron bastante más estables, con reducciones de  $1.5 \log_{10}$  y  $1.3 \log_{10}$  ufp/ml, respectivamente, tras un mes de incubación. El número de CG/ml del genoma de los fagos no varió prácticamente a pH7 o pH9, pero disminuyó  $1.5 \log_{10}$  a pH3.

Cuando los fagos Stx fueron sometidos a diversos tratamientos de inactivación, la persistencia de los fagos Stx (fagos infecciosos y genomas) se comparó con el fago SC12 (un fago virulento que infecta a *E. coli* WG5) y con la cepa STEC A557 serotipo O157:H7 (cepa a partir de la cual se aisló el fago  $\Phi 557$ ). Los fagos Stx mostraron una

inactivación de más de 3 log<sub>10</sub> después de un minuto de cloración, muy similar a la inactivación de SC12, aunque el número de CG/ml en los tres fagos disminuyó menos de 1 log<sub>10</sub> tras 20 minutos de tratamiento. Ni los fagos Stx ni SC12 mostraron elevada inactivación por el tratamiento con UV, mostrando reducciones en el número de fagos infecciosos de 2.2 log<sub>10</sub> después de 30 minutos. Los resultados de qPCR no mostraron reducciones significativas. En cuanto al tratamiento por calor, los fagos Stx presentaron una reducción de aproximadamente 2 log<sub>10</sub> en cualquiera de las condiciones, mientras que la inactivación de SC12 fue menor a 60°C pero mayor a 70°C. El número de genomas fágicos no variaron significativamente en el tratamiento por calor. En todos los tratamientos ensayados, la reducción de STEC fue siempre la más elevada, con valores superiores a 5 log<sub>10</sub> ufc/ml, en muchos casos, por debajo del límite de detección.

Se ensayaron condiciones de inactivación natural mediante experimentos en un mesocosmos. Para ello, se introdujeron los tres fagos y la cepa STEC dentro de membranas de diálisis, que a su vez se introdujeron en un estanque. El agua del estanque no estaba clorada y el estanque estaba sometido a variaciones de diversos factores ambientales, como la temperatura o la radiación solar. El pH se mantuvo estable a lo largo del experimento. Se realizaron experimentos en dos estaciones, verano e invierno. La inactivación de todos los microorganismos ensayados fue mayor en verano que en invierno, con disminuciones de los fagos Stx y SC12 de más de 4 log<sub>10</sub> ufc/ml tras 7 días de ensayo. En cuanto al número de CG/ml, se produjo una reducción de hasta 3 log<sub>10</sub> en verano, pero de menos de 1 log<sub>10</sub> en invierno. De nuevo, STEC presentó la mayor reducción (más de 7 log<sub>10</sub>), cayendo por debajo de su límite de detección.

La capacidad de los fagos Stx para producir lisógenos y transducir el gen de la toxina tras algunos de los tratamientos de inactivación se evaluó usando los mismos fagos Stx que en los experimentos anteriores, que habían sido modificados mediante la sustitución de un fragmento del gen *stx* por el gen de resistencia a cloranfenicol, generando los fagos recombinantes  $\Phi 534\Delta stx::cat$  y  $\Phi 557\Delta stx::cat$ . La generación de lisógenos por parte de estos fagos se podía evaluar mediante la selección de colonias resistentes al cloranfenicol generadas tras la incubación de la cepa huésped WG5 y los fagos recombinantes. Se comparó la generación de lisógenos antes y después de cada tratamiento. Aunque los datos que se presentan son cuantitativos, hay que tener en cuenta que los lisógenos se obtuvieron tras un paso de incubación y, por tanto, los datos deberían considerarse cualitativamente más que cuantitativamente. A pesar de ello, en general, el número de lisógenos obtenidos se correlacionó con el número de fagos infectivos que persistieron tras los tratamientos. Así, los lisógenos obtenidos antes de los

tratamientos fueron del orden de  $2 \log_{10}$  ufc/ml, mientras que tras la cloración y la luz UV el número fue mucho menor. No se obtuvieron lisógenos tras el tratamiento térmico.

#### Discusión

El principal mecanismo de movilización de la toxina Shiga entre diferentes cepas de *E. coli* y otros géneros bacterianos es la diseminación del gen *stx* por los fagos Stx. Esto supone un peligro potencial ya que puede ocasionar, mediante un proceso de transferencia horizontal, la aparición de nuevas cepas patógenas, siendo el brote en Alemania y Francia causado por una STEC 0104:H4 el caso más reciente (Buchholz *et al.*, 2011; King *et al.*, 2012). La hipótesis es que esta cepa adquirió un fago Stx liberado al medio ambiente por otra cepa STEC (Muniesa *et al.*, 2012), generando así una nueva cepa muy virulenta, tanto por su capacidad enteroagregativa como por la producción de la toxina (Bielaszewska *et al.*, 2011).

Los fagos Stx han sido aislados de diversos orígenes y ambientes (Muniesa and Jofre, 1998; Dumke *et al.*, 2006; Imamovic *et al.*, 2010; Martínez-Castillo *et al.*, 2013), reafirmando así su papel en la movilización de *stx* en el medio ambiente. Se ha sugerido una mayor persistencia de los fagos Stx aislados del medio ambiente respecto a las cepas STEC huésped bajo diferentes condiciones (Muniesa *et al.*, 1999a), así como la persistencia de fagos Stx bajo tratamientos aplicados a alimentos (Rode *et al.*, 2011). La persistencia de fagos Stx infecciosos se confirma en este estudio. Pero el verdadero problema radica en el hecho de que, tras estos tratamientos de inactivación, los fagos que persisten son capaces de transducir el gen *stx* a nuevas cepas huésped, implicando su papel potencial en la generación de nuevas cepas patógenas.

Hay que remarcar que en este estudio sólo se han evaluado dos fagos Stx, y se sabe que los fagos Stx son un grupo muy heterogéneo (Herold *et al.*, 2004; Muniesa *et al.*, 2004). Por eso, los resultados no tienen por qué extrapolarse a todos los fagos Stx, aunque los fagos evaluados pertenecen al grupo *Podoviridae*, que es el más común entre los fagos Stx.

En estudios anteriores, se había visto que algunos fagos Stx perdían su capacidad de infección tras unas horas a 4°C (O'Brien *et al.*, 1984). Esto resultaba contradictorio con la abundancia de fagos Stx en diversos ambientes extraintestinales descritos por nuestro grupo y por otros autores. Tras el presente estudio, se confirma que algunos fagos Stx sí que son capaces de resistir bajo diferentes condiciones y tras ciertos tratamientos de inactivación, resultados acordes con su elevada persistencia ambiental.

Pero todavía queda averiguar el verdadero riesgo que supone la transducción de *stx* bajo estas condiciones, y la correlación de esta transducción con la emergencia de nuevas cepas patógenas, aunque la conclusión de este estudio es que no se puede descartar el potencial de algunos fagos Stx en la generación de nuevas cepas de STEC.

#### Informe del factor de impacto

El artículo titulado “**Persistence of infectious Shiga toxin-encoding bacteriophages after disinfection treatments**” ha sido aceptado para su publicación en 2014 en la revista *Applied and Environmental Microbiology*, que tuvo un factor de impacto de 3,678 para el año 2012 y que pertenece al primer cuartil de la categoría Biotecnología y Microbiología Aplicada.

#### Informe de coautoría

La doctoranda realizó todos los procedimientos experimentales (inducción, tratamientos de inactivación, ensayos de infectividad y qPCR, generación de lisógenos, etc.) y participó en la redacción del artículo y el diseño de las figuras. Alexandre Martínez se encargó del análisis estadístico.



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

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

Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

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

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

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

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

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

## MATERIALS AND METHODS

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

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

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

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

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

Received 3 December 2013 Accepted 21 January 2014

Published ahead of print 24 January 2014

Editor: C. A. Elkins

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

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

doi:10.1128/AEM.04006-13

Stx2 bacteriophages, mitomycin C (0.5 µg/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 bacterial cultures through low protein-binding 0.22-µm pore size membrane filters (Millex-GP; Millipore Bedford, MA) and were enumerated by plaque blot analysis as described below. Phage lysates were diluted to obtain the same phage density for both phages (10<sup>6</sup> PFU/ml) used for the experiments. To be certain that no inactivation occurred other than that due to the treatment applied, fresh phage suspensions were prepared at the beginning of each experiment and then diluted and quantified to obtain the same densities of phages.

**Infectivity of bacteriophages.** The infectivity of the induced phages (Stx phages and SC12) after all treatments at different time intervals was evaluated using the double-agar layer technique (19), with *E. coli* WG5 grown to the exponential phase (OD<sub>600</sub> of 0.3) as the host strain. One milliliter of the culture was mixed with 1 ml of serial decimal dilutions of phage suspensions obtained before (time zero [t<sub>0</sub>]) and after the different treatments and 2.5 ml of LB soft agar (LB broth with 0.7% agarose) containing 0.5% glycerol. The mixture was poured onto LB plates and incubated at 37°C overnight. After incubation, SC12 plaques were directly enumerated. Plaques of Stx phages were transferred to a nylon membrane and enumerated after plaque blot hybridization as described below.

**Plaque blot hybridization.** Plates containing between 100 and 300 PFU were selected and the plaques were transferred to nylon membranes (Hybond N+; Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain). Membranes were hybridized according to a standard procedure (20) at 64°C with a 369-bp fragment digoxigenin (DIG)-labeled *stx*<sub>2</sub>-A probe (16) or a 1,015-bp fragment digoxigenin-labeled *cat* probe (17), prepared as described elsewhere. Stringent hybridization was carried out using a DIG DNA labeling and detection kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) in accordance with the manufacturer's instructions.

**Isolation of phage DNA.** Before (t<sub>0</sub>) and at different time intervals after each treatment, phage lysates were treated with DNase (0.2 mg/ml), proteinase K (0.5 mg/ml), and phenol-chloroform (1:1) to extract phage DNA, as described previously (20). Purified DNA was eluted in a final volume of 50 µl of sterile bidistilled water and quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, MA). The integrity of the DNA was confirmed by gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Purified DNA was used to quantify the number of gene copies (GC) by real-time qPCR.

**PCR procedures.** Conventional PCRs were performed using a GeneAmp 2700 PCR system (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). The primers for amplification of a fragment of the A subunit of the *stx*<sub>2</sub> gene were UP378 (GCGTTTTGACCATCTTCGT) and LP378 (ACAGGAGCA GTTTCAGACAG) (6).

Real time qPCR assays for *stx*<sub>2</sub> were used to quantify *stx* GC in the phage DNA (14). The primers and probes (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), as described previously (14). The *stx* real-time qPCR assay has an efficiency of 94 to 100% and a detection limit of 5.29 *stx* copies.

**Generation of lysogens with recombinant phages.** The ability of the Stx phages to generate lysogens after inactivation treatments was evaluated using the same Stx phages, in which a fragment of the *stx* was replaced by a chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene (Φ534Δ*stx*::*cat* and Φ557Δ*stx*::*cat*), which thereby confers resistance to chloramphenicol on those strains that have incorporated the Stx phage (17). Suspensions of the modified *stx*<sub>2</sub>::*cat* phages obtained by mitomycin C induction from their respective lysogens as described above were obtained. Infectious particles were enumerated by plaque blotting with the *cat*-DIG probe (17), and phage lysates were diluted to contain 10<sup>6</sup> PFU/ml. Phages in the suspension were used to lysogenize *E. coli* strain WG5 (the same strain used as the host when evaluating the infectivity of Stx phages) before and after inactivation with chlorination, UV radiation, and thermal treatment.

In these experiments, 1 ml of the phage suspension was mixed with 1 ml of the culture of the host strain grown to the exponential growth phase

(OD<sub>600</sub> = 0.5). The mixture was then incubated in 5 ml of LB broth for 15 h at 37°C in a shaker. Serial dilutions of this culture were plated onto LB agar with chloramphenicol (20 µg/ml).

Colonies suspected of being lysogens were confirmed via PCR using a combination of primers for Stx (rho-*stx* [ATATCTGCGCCGGTCTG]) and the primer located within the *cat* gene (inversCm5 [AACAGTACTG CGATGAGTG]) (amplicon of 448 bp).

**Influence of pH and temperature on Stx2 phages.** Stx phage lysates containing 10<sup>6</sup> PFU/ml of phage were incubated in 10-ml tubes at 4°C, 22°C, and 37°C for 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days.

Phage lysates containing 10<sup>6</sup> PFU/ml of each phage were adjusted to different pHs (3, 7, and 9) (by adding 37% HCl for pH 3 or 1 N NaOH for pH 9) and incubated in 10-ml tubes for 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days at 4°C. At each interval, pH was confirmed before conducting the infectivity and quantification assays.

**Inactivation conditions.** For Stx phages, infectivity was evaluated by plaque blotting and the number of genomic copies of *stx* in phage DNA was evaluated by real-time qPCR. As controls, the virulent phage SC12 was enumerated according to plaque formation, and STEC, used as the bacterial control, was enumerated according to colony growth on MacConkey agar plates.

Aliquots of phage lysates containing approximately 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> PFU/ml of the Stx phages, 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> PFU/ml of SC12, and 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> CFU/ml of STEC were used for the inactivation experiments.

For heat inactivation, the phages and bacteria were placed in 1.5-ml tubes and incubated in an incubator (Hybex Microarray Incubation System, SciGene) at 60°C and 70°C for 30 and 60 min.

For UV treatment, samples were placed 10 cm below an 8-W, germicidal UV lamp (model G30T8; 0.099-mW/cm<sup>2</sup> irradiance at a 253.7-nm wavelength; Sankyo Denki, Tokyo, Japan) for 1 to 30 min (21). The lamp was warmed up for 15 to 30 min before starting the experiments. The UV dose was calculated using the equation  $D = I \times T$ , where  $D$  is the dose,  $T$  is the exposure time (60, 300, 600, and 1,800 s), and  $I$  is the "fluence rate" (or intensity) of the lamp.

For chlorine inactivation, phage lysates and bacteria were diluted 1:20 in double-distilled water, to avoid any interference between organic matter in the media and the chlorine. Samples were treated with 10 ppm of chlorine supplied as sodium hypochlorite and incubated for 1, 3, 5, 10, and 20 min at room temperature (21°C). Residual chlorine was neutralized by adding 3% (wt/vol) sodium thiosulfate (22) before conducting the infectivity and quantification assays.

**Natural inactivation.** To simulate inactivation under natural conditions, we used an outdoor pond that was supplied with nonchlorinated water from a well and provided a habitat for some species of goldfish. Phage lysates and bacterial cultures were diluted 1:10 in the well water used for these experiments. To avoid interference with microorganisms present in the water, the well water was filter sterilized using 0.22-µm-pore-size membrane filters (Millipore, Bedford, MA). Suspensions containing each Stx phage, phage SC12, and STEC were separately placed into dialysis tubes (cutoff, 14 kDa), which were sealed and placed in the outdoor pond with a water volume of 60 m<sup>3</sup>, protected by a cage, at a depth of 20 cm. The experiments were performed in the summer (August; temperature of 19.5° to 29.5°C and solar radiation of 23 MJ/m<sup>2</sup>) and winter (February; temperature of 3.5 to 14.5°C and solar radiation of 8.0 MJ/m<sup>2</sup>). The pH (6.8) and turbidity (4.1 to 6.8 nephelometric turbidity units [NTU]) of the pond were stable at all times. The tubes containing the phage lysates and the bacterial cultures were collected at various intervals and analyzed.

**Statistical analyses.** Computation of data and 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 with each treatment and at the times assayed. For all statistical analyses,  $P$  values below 0.05 were considered significant.



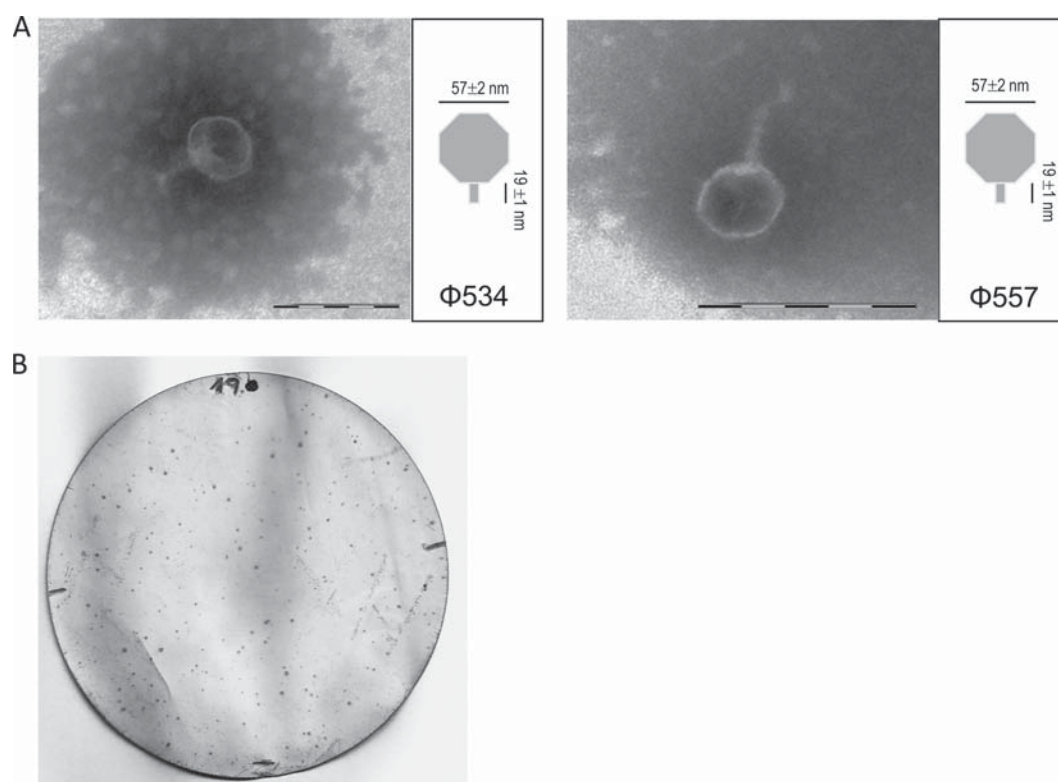


FIG 1 (A) Micrographs of Stx phages  $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557. Bar, 100 nm. (B). Positive signals of plaques of lysis generated by Stx phages on *E. coli* strain WG5 after plaque blot hybridization with a DIG-labeled *stx*<sub>2</sub>-A probe.

## RESULTS

Lysogenic laboratory strains containing Stx phages  $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557 showed a reduction in optical density after mitomycin C treatment, indicating induction of the lytic cycle by activation of temperate Stx phages present in the strains. On the basis of morphology, hexagonal head and short tail, these phages belong to the family *Podoviridae* (Fig. 1A) (23), which is one of the most representative among Stx2 bacteriophages. Accordingly, plaques of lysis were obtained after plating suspensions of Stx phages obtained from the induced lysogens onto an agar monolayer containing bacterial host strain *E. coli* WG5. The largest and clearest plaques were obtained in the presence of 5% glycerol in the LB soft agar, and therefore, this approach was used in subsequent experiments.

Although plaques of lysis were directly visible on the agar monolayer, many were small and difficult to visualize. For more accurate enumeration, plaque blot hybridization was performed. The data on infectious PFU presented in the following sections are based on counts of the plaque blot signals (Fig. 1B).

**Stability of Stx phages.** The stability and inactivation experiments were performed using two Stx phages ( $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557). Both phages were used at a concentration of  $10^6$  PFU/ml and showed very similar stabilities; therefore, the results are presented as the averages of the two Stx phages. Stx phages showed similar reductions in the number of PFU over time at different temperatures (Fig. 2, top). After 1 month of storage at 4°C a reduction of less than  $1.5 \log_{10}$  units was observed, while storage at 22°C led to a reduction of  $2.2 \log_{10}$  units. Phages showed less stability at 37°C, with PFU decreasing by less than  $2 \log_{10}$  units after the first week of storage but by more than  $4 \log_{10}$  units after 1 month. Reduction

of infectious phages was nevertheless statistically significant (ANOVA,  $P < 0.05$ ) for the three temperatures assayed.

Since Stx phages are only known to carry one *stx* copy, the *stx* GC values in phage DNA can be extrapolated to the number of genomes of Stx phages in each sample. The results of qPCR showed a nonsignificant ( $P > 0.05$ ) reduction, less than  $1 \log_{10}$ , in the number of Stx phage genomes at the three temperatures after 1 month.

Stability at different pH values was evaluated at 4°C, since that temperature showed the lowest reduction in the number of infectious Stx phages (or PFU) and therefore the lowest influence on stability. When exposed to low pH (pH 3.0), Stx phages lost their infectivity after only 1 day, and no plaques were observed (Fig. 1B). Accordingly, a significant reduction ( $P < 0.05$ ),  $1.5 \log_{10}$  units, of the Stx phage GC at pH 3.0 was also observed by qPCR; this was the only pH that caused a reduction in the number of Stx phage genomes. Stx phages showed almost identical inactivation,  $1.5$  and  $1.3 \log_{10}$  PFU/ml, respectively, at pHs 7.0 and 9.0 after 1 month of storage. The qPCR also reflected the stability at pHs 7.0 and 9.0, with reductions of less than  $0.3 \log_{10}$  GC/ml after 1 month. Reduction of Stx phages was statistically significant ( $P < 0.05$ ) at different pH values but not statistically significant ( $P > 0.05$ ) for qPCR values at pHs 7.0 and 9.0.

**Inactivation treatments.** The persistence of the Stx phages following different inactivation treatments was compared with that of phage SC12, a lytic phage infecting *E. coli* WG5, and the STEC wild-type strain A557 (serotype O157:H7, the strain from which phage  $\Phi$ 557 was isolated). These were exposed to chlorination, UV treatment and high temperatures (Table 1). The inactivation

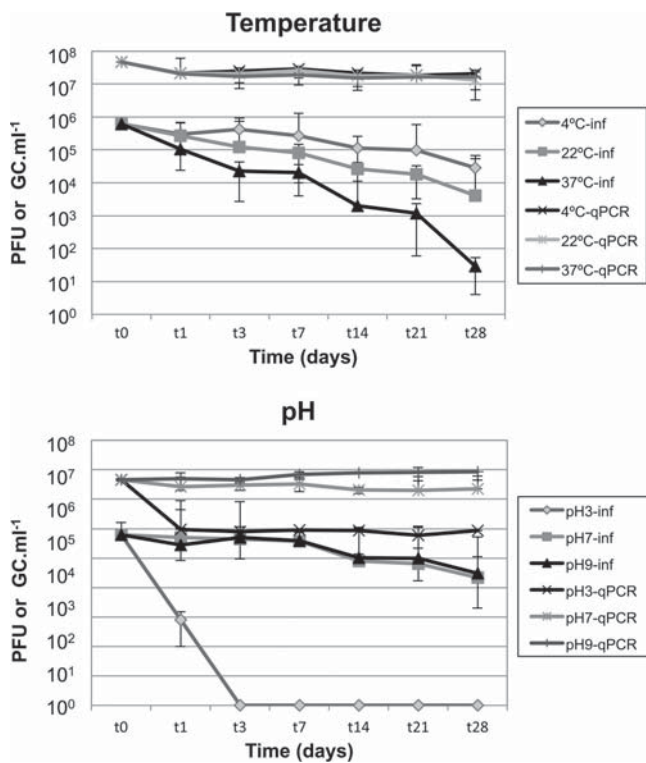


FIG 2 Stability of Stx phages after 1 month of storage at various temperatures (4°C, 22°C, and 37°C) and at different pHs (3, 7, and 9) after 1 month of storage at 4°C. Values for Stx phages are presented as the average of values obtained for phage  $\Phi$ 534 and phage  $\Phi$ 557. Infectious phages (inf) were evaluated by plaque blot and values expressed as PFU/ml. Phage genomes were evaluated by qPCR, and the results are expressed as GC/ml. Values for Stx phages are the averages of phage  $\Phi$ 534 and phage  $\Phi$ 557 in three independent experiments. The x axis is not presented at scale.

of Stx phages ( $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557 together), SC12, and STEC by these treatments was evaluated in three independent experiments for each condition.

The infectious Stx phages  $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557 showed significant ( $P < 0.05$ ) inactivation, more than 3  $\log_{10}$  units, after the first minute of chlorination, while the number of gene copies was not significantly ( $P > 0.05$ ) reduced, by less than 1  $\log_{10}$  unit, even after 20 min. The activity of phage SC12 was also significantly ( $P < 0.05$ ) reduced after 1 min of treatment. However, the strongest inactivation was observed for STEC, which, at almost  $10^5$  CFU/ml, fell below the limit of detection after the first minute of treatment.

In terms of UV treatment, we calculated estimated UV doses of 5.94, 29.7, 59.4, and 178.2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  at each time, and the approach allowed comparison between microorganisms, as shown previously (7, 21). The Stx phages  $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557 were not particularly sensitive to UV treatment and showed reductions in PFU of 2.2  $\log_{10}$  units after 30 min. Slightly higher inactivation was shown at all time points by phage SC12. Again, the STEC strain showed a reduction of more than 5  $\log_{10}$  units after only 5 min (29.7  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) of treatment. Infectious Stx phages, SC12, and STEC showed statistically significant reductions ( $P < 0.05$ ) over time. Analysis of the phage genomes revealed that the Stx phage particles were not affected by UV treatment since GC values did not decline significantly at any time (Student's  $t$  test,  $P > 0.05$ ) (Table 1).

Following heat treatment, the degree of inactivation of infectious particles was slightly lower after 30 than after 60 min, although the difference was not great and most of the inactivation seemed to have occurred during the first 30 min. Treatment at 60°C had an effect on inactivation similar to that of treatment at 70°C for Stx phages (around 2 to 2.5  $\log_{10}$  units of inactivation at both temperatures and times), whereas phage SC12 showed a significantly ( $P < 0.05$ ) lower inactivation at 60°C than at 70°C. Stx phage genomes were still detectable by qPCR and showed a nonsignificant ( $P > 0.05$ ) reduction in GC/ml, less than 1  $\log_{10}$  unit at all times intervals and temperatures, which indicates that at

TABLE 1  $\log_{10}$  reductions of Stx phages (infectious and genomes), infectious phage SC12 and STEC under three disinfection processes<sup>a</sup>

Treatment	Time (min)	$\log_{10}$ reduction			
		Stx phage			
		PFU/ml	GC/ml	Phage SC12, PFU/ml	STEC, CFU/ml
Chlorination (10 ppm)	1	3.29 (0.52)	0.13 (0.05)	4.58 (0.59)	4.89 (0.00)
	3	3.68 (0.53)	0.56 (0.03)	4.98(0.10)	>4.89 <sup>b</sup>
	5	3.73 (0.77)	0.60 (0.24)	4.88 (0.31)	>4.89
	10	4.24 (0.88)	0.55 (0.32)	5.25 (0.66)	>4.89
	20	4.79 (0.01)	0.62 (0.24)	5.80 (1.41)	>4.89
UV (0.099 $\text{mW}/\text{cm}^2$ )	1	0.44 (0.54)	-0.08 (0.00)	1.42 (0.68)	5.80 (0.00)
	5	1.15 (1.48)	-0.08 (0.00)	2.04 (0.87)	>5.80
	10	1.61 (0.98)	0.13 (0.02)	2.63 (0.13)	>5.80
	30	2.20 (0.69)	0.22 (0.10)	>3.00 <sup>b</sup>	>5.80
Heat, 60°C	30	1.85 (0.78)	0.58 (0.05)	0.62 (0.05)	5.07 (0.00)
	60	2.22 (1.26)	0.54 (0.02)	1.54 (0.94)	>5.07
Heat, 70°C	30	2.49 (0.80)	0.60 (0.12)	2.54 (0.48)	>5.07
	60	2.51 (1.02)	0.74 (0.07)	3.56 (1.02)	>5.07

<sup>a</sup> Reduction was calculated as the difference of each microorganism in  $\log_{10}$  units between the beginning of the experiment (time zero) and a given time. Results for Stx phages are the averages of those obtained with phage  $\Phi$ 534 and phage  $\Phi$ 557. Standard deviations are in parentheses.

<sup>b</sup> Below the detection limit.

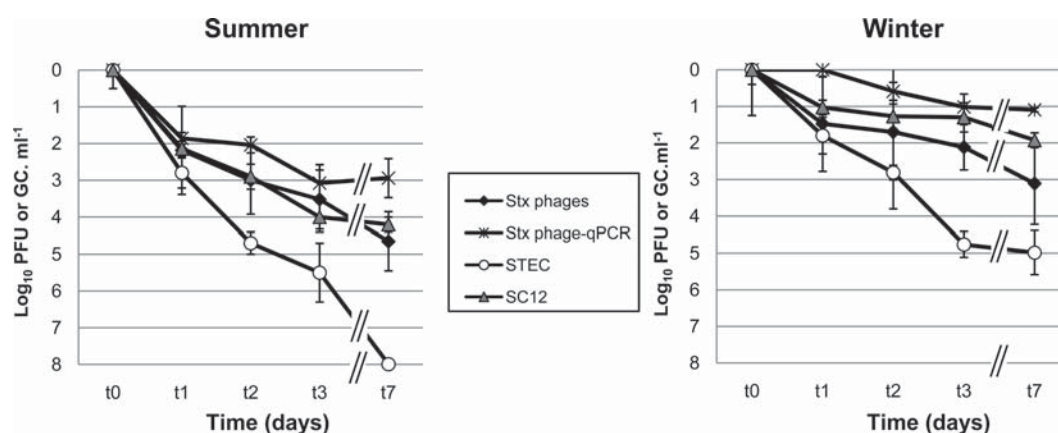


FIG 3 Logarithmic reduction calculated for Stx phages (infectivity and genomes), SC12 (infectivity), and STEC (colony counts) in an outdoor mesocosm in summer and winter. Values for Stx phages are presented as the average of values obtained for phage  $\Phi$ 534 and phage  $\Phi$ 557. All values are the average of three independent experiments conducted during the winter or summer season.

least the phage DNA containing the *stx* remained intact within the phage capsid and could be amplified. In contrast, a drastic reduction, 5  $\log_{10}$  units, was observed in the STEC strain after treatment at 60°C for only 30 min.

**Natural inactivation.** The inactivation of infectious Stx phages ( $\Phi$ 534 and  $\Phi$ 557), SC12, and STEC in the mesocosm was significantly higher ( $P < 0.05$ ) for all microorganisms evaluated in summer than in winter (Fig. 3). The strongest inactivation was shown by STEC in summer, with a decay of more than 7  $\log_{10}$  units, meaning that this microorganism fell below the detection limit. In summer, the Stx phages and phage SC12 decayed by more than 4  $\log_{10}$  units in 7 days and showed similar inactivation patterns, while phage SC12 persisted better than Stx phages in winter, showing 1  $\log_{10}$  unit less reduction than Stx phages. Although STEC showed lower inactivation in winter than in summer, it was still the least persistent entity in winter. The Stx phages evaluated by qPCR again showed the lowest reduction in this set of experiments, and their reductions were always lower than those of infectious Stx phages. However, although in winter only 1  $\log_{10}$  unit of reduction was observed, there was still a reduction in the amount of Stx phage genomes in summer of 3  $\log_{10}$  units, indicating that some factor in the mesocosm was degrading phage DNA, even by damaging the phage capsids, which would cause DNA release and degradation and as a consequence a GC reduction, or by affecting the integrity of the phage DNA inside the capsid. Reductions showed by all microorganisms, including evaluation of Stx phages by qPCR, were statistically significant ( $P < 0.05$ ) in the mesocosm experiments.

**Generation of lysogens by Stx phages after inactivation treatments.** The ability of the Stx phages to generate lysogens after the different inactivation processes was evaluated by counting chloramphenicol-resistant lysogens of *E. coli* strain WG5 generated after incubation with Stx phages. For these experiments, we used the same Stx phages as assayed previously but in which a fragment of *stx* was replaced by the *cat* gene, which confers chloramphenicol resistance, generating phages  $\Phi$ 534 $\Delta$ *stx*::*cat* and  $\Phi$ 557 $\Delta$ *stx*::*cat*. These phages allow chloramphenicol selection of the cells that they lysogenize. At time zero, 10% of the lysogens generated were confirmed by PCR, while all lysogens generated after inactivation experiments were confirmed by PCR.

The numbers of lysogenic colonies generated (Table 2) indicated the ability of phages to transduce *stx* after treatment, and although the results are presented as numerical data, it should be noted that these numbers were obtained after an incubation step (see Materials and Methods); therefore, the results should be considered qualitatively rather than quantitatively. For the same reason the results obtained for the two Stx phages are presented separately, and variations in the number of lysogens obtained for each one should therefore not be considered quantitatively (Table 2).

In general, the number of infectious Stx phages that persisted after treatment correlated with the number of lysogens generated with the exception of thermal treatment. The number of lysogens obtained before any treatment was 2  $\log_{10}$  units (Table 2), while after UV and chlorination treatment, a few lysogens were still generated but in very low numbers in the shortest times; no lysogens were observed when longer times of treatment were applied. However, no lysogens were generated after thermal treatment under any of the conditions assayed.

## DISCUSSION

Dissemination of the phages encoding the genes of Shiga toxin is the most likely mechanism accounting for the spread of these

TABLE 2 Ability of Stx phages to lysogenize *E. coli* strain WG5 after different inactivation processes

Treatment	Time (min)	No. of <i>E. coli</i> colonies (CFU/ml) generated <sup>a</sup>			
		$\Phi$ 534 $\Delta$ <i>stx</i> :: <i>cat</i>		$\Phi$ 557 $\Delta$ <i>stx</i> :: <i>cat</i>	
		1	2	1	2
None (before treatment)	0	300	110	407	210
Chlorination (10 ppm)	1	1	1	1	1
	3	0	0	0	0
UV (0.099 mW/cm <sup>2</sup> )	1	37	40	20	50
	10	4	0	8	10
Heat, 60°C	30	0	0	0	0
Heat, 70°C	30	0	0	0	0

<sup>a</sup> The results of two independent experiments (1 and 2) are presented.

toxin genes among diverse *E. coli* strains and other bacterial genera. Human infections indicate that the STEC strains most commonly associated with HUS belong to particular serogroups, including O26, O45, O111, O103, O121, and O145, accounting for the non-O157 serotype, plus O157:H7 (24) and serotype O104:H4, which has recently been included. However, the transduction of *stx* genes could lead to the emergence of new pathogenic clones that have not yet been described. Among multiple examples of bacterial conversion by Stx phages *in vivo* and *in vitro* (16, 25–29), the STEC O104:H4 strain that caused the huge outbreak of HUS in Germany in May 2011, and that also affected France, is the most recent case (30, 31).

The German O104:H4 strain presumably acquired the Stx phage in a late evolutionary event, generating a highly virulent pathogen that, unlike other enteroaggregative *E. coli* strains, produced the Shiga toxin (32). The Stx phage in the O104:H4 strain was closely related to a particular Stx phage of an *E. coli* O111 strain (33), suggesting that the Stx phage was released by another STEC strain and that after an undetermined period of persistence in the environment, it infected and lysogenized the German strain (34). The origin of this Stx phage is unknown, and although recent reports indicate that the Stx2a phage in this strain is similar to those found in STEC isolated from cattle in Germany (35), other sources of the Stx phage that could better explain the origin and epidemiology of the strain should not be ruled out.

Stx phages have been found in various environments (5, 6, 8–14, 16), and this gives a clue to their role in the permanence and mobilization of *stx* in extraintestinal environments. However, the success of this spread among the bacterial population depends on their ability to retain their infectious abilities under the conditions found in a given environment. Stx phages have been shown to retain their stability and infectivity under various food-related conditions (36) and, to some extent, in the presence of certain food preservatives (37).

In the present study, the STEC was inactivated by 1.5 to 5.4  $\log_{10}$  units more than Stx phages following inactivation treatments and by 2 to 3  $\log_{10}$  units more than Stx phages under natural inactivation conditions. This is consistent with previous reports (7). Phage SC12, which showed lower persistence in laboratory experiments, persists similarly to or better than Stx phages in the mesocosm. SC12 is a phage isolated from river water (18), and it could be better adapted to natural inactivation than the temperate Stx phages. It should also be noted that the mesocosm used to evaluate natural inactivation allowed the simultaneous evaluation of the effect of a range of factors, with the likely exception of the effect of grazing by protozoa. Nevertheless, the latter has been reported to influence STEC survival, leading to greater persistence of Stx-positive bacteria than non-Stx bacteria (38) but having no effect on phages (39). Furthermore, the inactivation observed in the mesocosm could be attributable to solar radiation and/or temperature, as pH and other factors were relatively constant over time. The uncertainty regarding these factors makes it difficult to explain the reduction in genome copies observed, but in any case, solar radiation would seem to be the most critical inactivating factor, alone or as a part of a synergistic effect with other factors, affecting either the integrity of the phage capsids and/or the phage DNA. Radiation and oxidation agents have been reported to result in modifications to viral proteins (capsid protein backbone cleavage) and nucleic acids (40). Nevertheless, important variations can be observed depending on the virus assayed, and previous

studies in the same mesocosm system with other phages showed similar reduction of infectious phages but almost no reduction when evaluating phage genomes by qPCR (21).

The low decay of *stx* copies from Stx phages after different treatments indicated that the phage DNA, at least in the fragment used to amplify the *stx* gene, remained unaltered despite these treatments. These results were not correlated with the decay in infectivity, however, as demonstrated previously (14) and confirmed in this study. Molecular methods provide a lot of information and are easy to perform for some viruses, like Stx phages, but they do not provide information of their infectivity. Infectious methods are also limited by the use of the right host strain (or cell culture). For Stx phages there is an additional limitation because the plaques generated are sometimes poorly visible. The comparison of infectivity and qPCR methods in the present study shows a better picture of Stx phage inactivation than the use of plaque assay alone. The differences between both approaches should be considered in those studies evaluating the abundance of Stx phages in different environments, which are mostly done by qPCR methods (11–14). Moreover, the potential danger of these phages stems from their ability to generate lysogens. An interesting finding of our study is that some Stx phages persist sufficiently to retain their capability to lysogenize an *E. coli* strain after some disinfection processes. This capability is shown, however, at low rates, particularly in chlorination, and with the exception of thermal treatment. Although the causes of inhibition of lysogeny after thermal treatment are unknown, the treatment should affect the mechanisms of the phage for the establishment of lysogeny while not its ability to cause lysis.

The generation of lysogens after the treatments is particularly important because of the implications that lysogenization could have for the emergence of new strains in extraintestinal environments, which can be the real threat to human health. The lysogens in our experiments were selected by antibiotics to facilitate the detection on the agar plates, and lower frequencies would probably be obtained without selection, but it should be noted that the lysogenization step in liquid culture was conducted without any antibiotic selection (see Materials and Methods). Our assays, which were conducted under laboratory conditions, may or may not be the most optimal for lysogenization, since transduction under “*in vivo*” conditions seems to be very effective (25, 26, 28, 29). The Stx phage induced from the Norwegian O103:H25 isolate was shown to be capable of lysogeny after storage in a dry-fermented sausage model (36).

Two Stx phages were evaluated in this study, although it is well known that Stx phages are a highly heterogeneous group (3, 9, 16). The results presented herein are therefore not necessarily applicable to all Stx phages, but the two phages in this study were selected considering their characteristics and for practical reasons. They were both induced from O157:H7 strains, and although they are genetically different (16), they present the morphology of *Podoviridae* phages, a morphological type commonly found in Stx2 phages (16) and to which the prototype Stx2phage 933W belongs (41). Finally, both phages generate phage suspensions after induction from their lysogens with a constantly high number of phages, which allowed the replicates presented in our study. Other studies on the survival of Stx phages have been conducted using only one Stx phage of the same morphological type (36, 37).

The previous observations of our group and other authors (16, 36, 42, 43) suggest that certain Stx phages (including phage 933W)



(44) tend to lose infectivity when they are induced from their lysogenic host and stored for a few hours at 4°C. These previous observations were contradictory with the fact that a substantial number of infectious Stx phages were detectable in extraintestinal environments and that there was no plausible explanation at that time. In the light of the present results, it now seems clear that some Stx phages can remain infectious even after storage, which is consistent with their widespread occurrence in extraintestinal environments. Moreover, since Stx phages could be found in food-related environments, their persistence after storage should be considered in terms of permanence in food and the potential ingestion of Stx phages by the consumers.

Generally speaking, because of their simple structure and composition, numerous bacteriophages persist relatively successfully in the environment and are relatively resistant to natural and anthropogenic stressors (7, 18, 45). Our results are also consistent with reports on other *E. coli* phages after either thermal treatment (46, 47), UV treatment (48, 49), or chlorination (7, 21, 50). Chlorinating water with 10 ppm of chlorine would inactivate bacteria, which would be considered suitable for consumption according to current practices in many parts of the world. However, Stx phages may still be detected in chlorinated samples. Stx phages are not the only example of phages encoding virulence genes that persist under certain inactivation conditions more than their bacterial hosts (21). Moreover, some environmental conditions, such as sunlight, could even cause the induction of temperate bacteriophages (51). The real extent and risk of transduction of *stx* genes by temperate phages under these conditions, and the correspondence between these transduction events and the emergence of new virulent STEC strains, remain to be elucidated.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study 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). Anna Allué-Guardia has a grant from the Generalitat de Catalunya.

## REFERENCES

- Erickson MC, Doyle MP. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 70:2426–2449.
- Melton-Celsa A, Mohawk K, Teel L, O'Brien A. 2012. Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 357:67–103. [http://dx.doi.org/10.1007/82\\_2011\\_176](http://dx.doi.org/10.1007/82_2011_176).
- Herold S, Karch H, Schmidt H. 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. *Int. J. Med. Microbiol.* 294:115–121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.023>.
- Noris M, Mescia F, Remuzzi G. 2012. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat. Rev. Nephrol.* 8:622–633. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2012.195>.
- 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>.
- 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.
- 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.
- Tanji Y, Mizoguchi K, Akitsu T, Morita M, Hori K, Unno H. 2002. Fate of coliphage in waste water treatment process and detection of phages carrying the Shiga toxin type 2 gene. *Water Sci. Technol.* 46(11-12):285–289.
- Muniesa M, Serra-Moreno R, Jofre J. 2004. Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* genes appeared conserved. *Environ. Microbiol.* 6:716–725. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00604.x>.
- Dumke R, Schröter-Bobsin U, Jacobs E, Röske I. 2006. Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:48–53. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01809.x>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- Santos SB, Carvalho CM, Sillankorva S, Nicolau A, Ferreira EC, Azeredo J. 2009. The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiol.* 9:148. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-148>.
- Muniesa M, Blanco JE, De Simón M, Serra-Moreno R, Blanch AR, Jofre J. 2004. Diversity of *stx*<sub>2</sub> converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* 150:2959–2971. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27188-0>.
- Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, Jofre J, Muniesa M. 2006. Use of the lambda red recombinase system to produce recombinant phages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Mol. Biol.* 7:31. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-7-31>.
- Durán AE, Muniesa M, Méndez X, Valero F, Lucena F, Jofre J. 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* 92:338–347. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x>.
- Adams MH. 1959. Bacteriophages, p 27–30. Interscience Publishers, New York, NY.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Allué-Guardia A, Jofre J, Muniesa M. 2012. Stability and infectivity of cytolethal distending toxin type V gene-carrying bacteriophages in a water mesocosm and under different inactivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5818–5823. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00997-12>.
- Durán AE, Muniesa M, Mocé-Llivina L, Campos C, Jofre J, Lucena F. 2003. Usefulness of different groups of bacteriophages as model microorganisms for evaluating chlorination. *J. Appl. Microbiol.* 95:29–37. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.t01-1-01948.x>.
- Franki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F (ed). 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
- USDA Food Safety and Inspection Service. 2011. Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC). USDA Food Safety and Inspection Service, Washington, DC. [http://www.fsis.usda.gov/pdf/non\\_o157\\_stec\\_risk\\_profile.pdf](http://www.fsis.usda.gov/pdf/non_o157_stec_risk_profile.pdf).
- Acheson DW, Reidl J, Zhang X, Keusch GT, Mekalanos JJ, Waldor MK. 1998. *In vivo* transduction with Shiga toxin 1-encoding phage. *Infect. Immun.* 66:4496–4498.
- Schmidt H, Bielaszewska M, Karch H. 1999. Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage  $\phi$ 3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3855–3861.
- James CE, Stanley KN, Allison HE, Flint HJ, Stewart CS, Sharp RJ, Saunders JR, McCarthy AJ. 2001. Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4335–4337. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.9.4335-4337.2001>.
- Tóth I, Schmidt H, Dow M, Malik A, Oswald E, Nagy B. 2003. 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.* 69:7242–7247. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.12.7242-7247.2003>.
29. Solheim HT, Sekse C, Urdahl AM, Wasteson Y, Nesse LL. 2013. Biofilm as an environment for dissemination of *stx* genes by transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:896–900. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03512-12>.
  30. Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Deleré Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Höhle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Lubber P, Rosner B, Stark K, Kühne M. 2011. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N. Engl. J. Med.* 365:1763–1770. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1106482>.
  31. King LA, Nogareda F, Weill FX, Mariani-Kurkdjian P, Loukiadis E, Gault G, Jourdan-DaSilva N, Bingen E, Macé M, Thevenot D, Ong N, Castor C, Noël H, Van Cauteren D, Charron M, Vaillant V, Aldabe B, Goulet V, Delmas G, Couturier E, Le Strat Y, Combe C, Delmas Y, Terrier F, Vendrely B, Rolland P, de Valk H. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenu-greek sprouts, France, June 2011. *Clin. Infect. Dis.* 54:1588–1594. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis255>.
  32. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* 11:671–676. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70165-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70165-7).
  33. Laing CR, Zhang Y, Gilmour MW, Allen V, Johnson R, Thomas JE, Gannon VP. 2012. A comparison of Shiga-toxin 2 bacteriophage from classical enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes and the German *E. coli* O104:H4 outbreak strain. *PLoS One* 7:e37362. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037362>.
  34. Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, Appel B, Brüßow H. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4065–4073. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00217-12>.
  35. Beutin L, Hammerl JA, Reetz J, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.001>.
  36. 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>.
  37. Subils T, Aquili V, Ebner G, Balagué C. 2012. Effect of preservatives on Shiga toxicogenic phages and Shiga toxin of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 75:959–965. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-332>.
  38. Mauro SA, Opalko A, Lindsay K, Colon MP, Koudelka GB. 2013. The microcosm mediates the persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in freshwater ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:4821–4828. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01281-13>.
  39. Gonzalez JM, Sherr EB, Sherr BF. 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:583–589.
  40. Wigginton KR, Pecson BM, Sigstam T, Bosshard F, Kohn T. 2012. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.* 46:12069–12078. <http://dx.doi.org/10.1021/es3029473>.
  41. Plunkett G, III, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR. 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.
  42. Fuchs S, Mühlendorfer I, Donohue-Rolfé A, Kerényi M, Emödy L, Alexiev R, Nenkov P, Hacker J. 1999. Influence of RecA on *in vivo* virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb. Pathog.* 27:13–23. <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.1999.0279>.
  43. de Sablet T, Bertin Y, Vareille M, Girardeau JP, Garrivier A, Gobert AP, Martin C. 2008. Differential expression of *stx*<sub>2</sub> variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. *Microbiology* 154:176–186. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/009704-0>.
  44. 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>.
  45. Ackermann HW, Tremblay D, Moineau S. 2004. Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newsl.* 38:35–40.
  46. Mocé-Llivina L, Muniesa M, Pimenta-Vale H, Lucena F, Jofre J. 2003. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1452–1456. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.3.1452-1456.2003>.
  47. Cunault C, Pourcher AM, Burton CH. 2011. Using temperature and time criteria to control the effectiveness of continuous thermal sanitation of piggery effluent in terms of set microbial indicators. *J. Appl. Microbiol.* 111:1492–1504. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05144.x>.
  48. Tartera C, Bosch A, Jofre J. 1988. The inactivation of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* by chlorine treatment and UV-irradiation. *FEMS Microbiol. Lett.* 56:313–316. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb03198.x>.
  49. Lee HS, Sobsey MD. 2011. Survival of prototype strains of somatic coliphage families in environmental waters and when exposed to UV low-pressure monochromatic radiation or heat. *Water Res.* 45:3723–3734. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.024>.
  50. Dee SW, Fogelman JC. 1992. Rates of inactivation of waterborne coliphages by monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3136–3141.
  51. Faruque SM, Asadulghani, Rahman MM, Waldor MK, Sack DA. 2000. Sunlight-induced propagation of the lysogenic phage encoding cholera toxin. *Infect. Immun.* 68:4795–4801. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.68.4.4795-4801.2000>.

**3.4. Evolución de un fago Cdt-V auto-inducible,  
desde *Escherichia coli* O157:H7 hasta *Shigella  
sonnei***





## **Evolución de un fago auto-inducible que codifica para la “Cytotolethal Distending Toxin” de tipo V, desde *Escherichia coli* O157:H7 hasta *Shigella sonnei***

**Anna Allué-Guardia**, Lejla Imamovic y Maite Muniesa\*

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Diagonal 643, Anexo, Planta 0, 08028 Barcelona, España

### Introducción

En estudios anteriores se ha observado que los fagos son mucho más resistentes que sus bacterias huésped a los tratamientos habituales de desinfección e inactivación natural (Allué-Guardia *et al.*, 2012), hecho que los convierte en potenciales candidatos para la movilización del gen *cdt* en el medio ambiente.

Existe una clara relación entre la producción de toxina Cdt y los serotipos patogénicos de STEC (“Shiga toxin-producing *Escherichia coli*”) (Tóth *et al.*, 2003; Friedrich *et al.*, 2006; Bielaszewska *et al.*, 2009). Se han realizado numerosos estudios sobre los fagos Stx, pero poca es la información existente sobre los mecanismos de inducción de los fagos Cdt, su espectro de huéspedes o su capacidad de transmisión del gen *cdt* a otras cepas. Esto es debido al limitado número de fagos Cdt inducibles descritos hasta el momento.

### Objetivos y metodología

En previos estudios se analizaron algunos fagos Cdt-V inducidos de cepas ambientales (Allué-Guardia *et al.*, 2011). De todos estos, en este estudio, se aisló un fago Cdt-V ( $\Phi$ AA91) a partir de una cepa STEC O157:H7 ambiental aislada de agua residual urbana. Este fago se seleccionó porque producía niveles estables de fagos tras el crecimiento de su lisógeno y porque producía calvas de lisis muy claras. Tal como se había analizado anteriormente con otros fagos Cdt, se estudió su inducción con varios agentes inductores (mitomicina C, ciprofloxacina y EDTA) que, a concentraciones subinhibitorias, activan el ciclo lítico de los fagos, así como su capacidad para infectar y transducir el gen *cdt* a otras cepas huésped.

Dado que la cepa original contenía fagos Stx, y a fin de evitar las interferencias del fago Stx o de otros posibles fagos existentes en la cepa original, se lisogenizó la cepa

*Shigella sonnei* 866, que no presentaba otros fagos inducibles. El fago original inducido de la cepa *E. coli* O157:H7 se llamó  $\Phi$ AA91, y el fago inducido a partir del lisógeno de la cepa *S. sonnei* se llamó  $\Phi$ AA91-ss, para diferenciarlo del inducido a partir de la cepa de *E. coli* ambiental original. A partir de ambos fagos ( $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss) se realizaron análisis de infectividad, de la capacidad de lisogenizar diferentes cepas huésped, estudios morfológicos y se realizó la secuenciación fágica completa del fago  $\Phi$ AA91-ss y comparación con el fago  $\Phi$ AA91.

### Resultados

Los dos fagos ( $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss) observados por microscopía electrónica presentaron una morfología igual, perteneciente a los fagos de tipo *Myoviridae* (Franki *et al.*, 1991), con una cápside de  $55\pm 6$  nm de diámetro y una cola contráctil de  $155\pm 12$  nm. Al mirar el lugar de inserción en el cromosoma bacteriano, vimos que era el mismo para los dos fagos ( $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss).

Se usaron diferentes agentes inductores y se midió la DO a 600 nm, la infectividad sobre una cepa huésped *E. coli* WG5 y las copias genómicas (CG)/ml por qPCR a diferentes tiempos. La DO no presentó una reducción significativa con ninguno de los agentes inductores respecto a la cepa sin inducir, así como tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en la infectividad ni en el número de CG/ml. Por tanto, podemos decir que se trata, como otros fagos Cdt descritos (Allué-Guardia *et al.*, 2011), de un fago de inducción espontánea.

Se hizo un estudio de la infectividad y la generación de lisógenos sobre 57 cepas huésped. Ambos fagos presentaban idéntico espectro de huéspedes respecto a su capacidad de provocar lisis bacteriana, siendo capaces de infectar a un 59.6% de cepas. Se observó, sin embargo, que el fago inducido a partir de la cepa de *S. sonnei* ( $\Phi$ AA91-ss) generaba un 22.8% de lisógenos en esta colección de cepas, mientras que el fago original ( $\Phi$ AA91) sólo generaba lisógenos en un 1.75% de las cepas, a pesar de presentar ambos el mismo valor de infectividad. Se realizó una secuenciación completa del genoma de  $\Phi$ AA91-ss (33.628 pb), en la que se determinó que se trataba de un fago de tipo P2, con los genes *cdt* localizados antes del extremo *CosR*, en la zona de recombinación TO. Al comparar la secuencia del genoma de este fago con la del fago original inducido a partir de la cepa ambiental ( $\Phi$ AA91), observamos que había una diferencia importante a nivel genético: la inserción de una secuencia (IS21) compuesta por dos ORFs insertada en medio del gen *cox*. La mutación de este gen no interfería en

la inducción ni en la capacidad de lisis, pero implicaba un incremento en la capacidad de generar lisógenos de entre 5-20 veces.

Para determinar si el elemento de inserción IS21 aparecía en la cepa original o se había incorporado tras la lisogenización en *Shigella*, realizamos una serie de ensayos de PCR para detectar si las uniones izquierda y derecha entre *cox* y IS21 aparecían en las cepas huéspedes o si, por el contrario, *cox* estaba intacto. En la cepa O157:H7 original (con el fago  $\Phi$ AA91), no se detectó el elemento de inserción, y *cox* aparecía intacto. En la cepa huésped *Shigella sonnei*, encontramos IS21, aunque *cox*, perteneciente al fago, no estaba presente. En el lisógeno conteniendo el fago  $\Phi$ AA91-ss se confirmó la presencia de IS21, se amplificaron las uniones *cox*-IS21 y no se amplificó *cox*. Estos resultados permitieron determinar que la incorporación de la secuencia de inserción se había producido tras la lisogenización del fago  $\Phi$ AA91 en *Shigella*.

### Discusión

Los fagos P2 son un grupo diverso y ampliamente extendido en *E. coli* y otros grupos bacterianos (Bullas *et al.*, 1991; Nakayama *et al.*, 1999). El hecho de que  $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss sean fagos de tipo P2 explica que los agentes inductores no tengan efecto sobre la activación del ciclo lítico, puesto que la proteína C (represora de la lisogenia) no puede ser cortada por la proteína RecA. Esto hace que se mantengan siempre los mismos niveles de inducción fágica, puesto que los fagos P2 no pueden activar el ciclo lítico con la presencia de inductores (Lundqvist *et al.*, 1984; Bertani *et al.*, 1988).

La principal diferencia entre los fagos  $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss es la secuencia IS21 insertada en este último, que se ha producido tras la lisogenización en una cepa de *Shigella*. Las secuencias de inserción son muy comunes en *E. coli* y *Shigella*, y provocan diferentes cambios en el genoma, como deleciones, inserciones o intercambios genéticos (Yang *et al.*, 2005). En este caso, IS21 se insertó en medio del gen *cox*, que codifica la proteína Cox, responsable de la inhibición de la integración fágica y de la activación de la excisión (Saha *et al.*, 1987). De este modo, una mutación en *cox* produjo cambios en la capacidad de generar lisógenos, aumentando entre 5-20 veces. Este incremento, que ya se había descrito a nivel teórico (Lindahl *et al.*, 1972; Bertani *et al.*, 1988), es el que se observó en  $\Phi$ AA91-ss. Este hecho demuestra la evolución de los fagos tras infectar a una nueva cepa huésped, cosa que le permite seleccionar a las variantes fágicas con más ventajas evolutivas, en este caso mayor capacidad de integración en la cepa huésped lo que le permite una mayor capacidad de generación de lisógenos.

Los genes *cdt* están insertados en una región del genoma fágico llamada TO, tal y como ya se ha descrito anteriormente en otro fago Cdt (Odegrip et al., 2006; Nilsson et al., 2007; Allué-Guardia et al., 2011). Es una región de elevada recombinación, y es muy variable dentro de los profagos de tipo P2 en *E. coli*.

Los fagos  $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss presentaron una morfología *Myoviridae*, aunque también se han descrito otros fagos Cdt de morfología *Siphoviridae* (Asakura et al., 2007; Allué-Guardia et al., 2011). Además, la homología con fagos P2 de las regiones flanqueantes de fagos Cdt-V ha sido ampliamente descrita (Svab et al., 2013; Allué-Guardia et al., 2011), pero también se ha visto que estas regiones no están siempre relacionadas con los P2 (Tóth et al., 2009). Esta variabilidad dentro del grupo de fagos Cdt no es extraña, considerando la gran capacidad de éstos de intercambiar, adquirir o perder genes de diferentes orígenes. Y la amplia distribución de fagos de tipo P2 en diferentes géneros bacterianos también apoya el hecho de que los genes *cdt* estén ampliamente distribuidos.

Este estudio es un ejemplo, no sólo de la capacidad de los fagos de adquirir o intercambiar genes, sino de la evolución de los fagos al pasar de una cepa huésped a otra, cosa que permite seleccionar tipos de fago capaces de generar un mayor número de lisógenos.

#### Informe del factor de impacto

El artículo titulado “**Evolution of a Self-Inducible Cytolethal Distending Toxin Type V-Encoding Bacteriophage from *Escherichia coli* O157:H7 to *Shigella sonnei***” fue publicado en diciembre de 2013 en la revista *Journal of Virology* 87(24):13665-13675, que tuvo un factor de impacto de 5,076 para el año 2012 y que pertenece al primer cuartil de la categoría Virología.

#### Informe de coautoría

La doctoranda realizó la mayoría de los procedimientos experimentales (ensayos de inducción, PCR, qPCR, caracterización morfológica) y participó en la redacción del artículo y el diseño de las figuras. La Dra. Lejla Imamovic fue la encargada del ensamblaje y participó en el análisis de la secuencia fágica obtenida.

# Evolution of a Self-Inducible Cytolethal Distending Toxin Type V-Encoding Bacteriophage from *Escherichia coli* O157:H7 to *Shigella sonnei*

Anna Allué-Guardia, Lejla Imamovic, Maite Muniesa

Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Some *cdt* genes are located within the genome of inducible or cryptic bacteriophages, but there is little information about the mechanisms of *cdt* transfer because of the reduced number of inducible Cdt phages described. In this study, a new self-inducible *Myoviridae* Cdt phage ( $\Phi$ AA91) was isolated from a nonclinical O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain and was used to lysogenize a *cdt*-negative strain of *Shigella sonnei*. We found that the phage induced from *S. sonnei* ( $\Phi$ AA91-ss) was not identical to the original phage.  $\Phi$ AA91-ss was used to infect a collection of 57 bacterial strains, was infectious in 59.6% of the strains, and was able to lysogenize 22.8% of them. The complete sequence of  $\Phi$ AA91-ss showed a 33,628-bp genome with characteristics of a P2-like phage with the *cdt* operon located near the *cosR* site. We found an IS21 element composed of two open reading frames inserted within the *cox* gene of the phage, causing gene truncation. Truncation of *cox* does not affect lytic induction but could contribute to phage recombination and generation of lysogens. The IS21 element was not present in the  $\Phi$ AA91 phage from *E. coli*, but it was incorporated into the phage genome after its transduction in *Shigella*. This study shows empirically the evolution of temperate bacteriophages carrying virulence genes after infecting a new host and the generation of a phage population with better lysogenic abilities that would ultimately lead to the emergence of new pathogenic strains.

Cytolethal distending toxin (Cdt) belongs to the AB<sub>2</sub> type of toxins that block the G<sub>2</sub> and early M phases during mitosis (1, 2). As a result, the cells do not divide, but since they continue to grow, they may distend up to five times their normal size before disintegration. Cdt is a virulence factor that benefits bacterial survival and enhances microbial pathogenicity (2). Cdts have an important role in the *in vivo* pathogenesis of Cdt-producing bacteria, causing severe complications, as demonstrated in mouse models (3).

The Cdt operon comprises three adjacent genes (*cdtA*, *cdtB*, and *cdtC*) that must be expressed for Cdt to initiate cellular toxicity. CdtB encodes the catalytic subunit, homologous to the mammalian DNase I, and CdtA and CdtC are binding proteins that deliver CdtB into the eukaryotic cells, with cytotoxic effects (3, 4). The complete Cdt operon has been reported in several Gram-negative bacteria, including *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter* spp., and *Vibrio* (4–8). The Cdt subunits of a given genus show various degrees of similarity to the Cdt proteins of other genera.

The *cdt* operon is generally described as being located on the chromosome of Cdt-producing bacteria. However, in *E. coli*, five variants of Cdt have been described with different locations. Some variants are encoded by chromosomal genes (Cdt-II) (8) or by a pVir plasmid (Cdt-III) (9), and others are flanked by prophage genes, mostly bacteriophage P2 and bacteriophage lambda sequences (Cdt-I, Cdt-IV, and Cdt-V). A few studies have suggested that *cdt* genes in *E. coli* are located within prophages that could be defective (10–13) or within inducible bacteriophages (14, 15). Analyses of *cdt* flanking regions suggest that the *cdt-I* and *cdt-IV* genes have been acquired from a common ancestor by phage transduction and then evolved in their bacterial hosts (11).

Most available information about Cdt-producing strains pertains to clinical isolates. Recently, environmental strains harbor-

ing Cdt-V-encoding phages were described (14). Moreover, Cdt phages were detected in fecally polluted waters (14, 16) and showed high persistence under different disinfection processes and under natural inactivation conditions (16). Therefore, these phages may be interesting candidates for the mobilization of *cdt* genes in the environment. As with other virulence genes, the spread of *cdt* can lead to the emergence of new pathogenic strains or strains with increased virulence (17).

There is a clear relationship between Cdt production and pathogenic serotypes of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) (10, 18, 19). While several studies have been conducted for other *E. coli* phages, including Stx phages, the relative frequency of the different Cdt phages in relevant pathotypes is not well defined. The information required about the mechanisms of induction of Cdt phages, their host range for lytic infection, and their ability to generate lysogens and to transduce *cdt* still is not available for Cdt phages. The limited number of inducible Cdt phages described so far represents an additional challenge for studying and understanding the role of these phages in *cdt* mobilization.

This study focuses on a new Cdt-V phage isolated from an *E. coli* O157:H7 strain from urban raw wastewater. We characterize its capacity for induction, infection, and transduction, and we present the complete phage genome sequence. Our study has revealed that the phage, during the lysogenization of a *Shigella* strain, has evolved and acquired new genes (an insertion element composed of two genes). We discuss how this genetic acquisition

Received 30 September 2013 Accepted 2 October 2013

Published ahead of print 9 October 2013

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

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

doi:10.1128/JVI.02860-13

could influence the abilities of the phage to generate new lysogens and transduce the toxin gene.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, serotyping, bacteriophages, and media.** The Cdt phage in this study, named ΦAA91, was detected in a Cdt-positive *E. coli* strain of serotype O157:H7 strain 91 isolated from urban raw wastewater. This phage was induced from the wild-type strain as described below and used to lysogenize a collection of strains used as hosts for lytic infection and transduction (Table 1). A lysogen of the phage ΦAA91 in *Shigella sonnei* strain 866 was obtained. To avoid confusion, here the phage induced from the *S. sonnei* lysogen is called ΦAA91-ss. Luria-Bertani (LB) broth or LB agar was set to culture the bacteria. When necessary, media were supplemented with ampicillin (100 μg/ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

**PCR studies.** PCRs were performed using a GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain) with the oligonucleotides listed in Table 2. Screening for *cdt* was performed by multiplex *cdt* PCR (Table 2), and then the identity of the *cdt* variants was analyzed with the specific oligonucleotides. Purified DNA was diluted 1:20 in double-distilled water. The PCR product was analyzed by gel electrophoresis, and bands were visualized by ethidium bromide staining. When necessary, PCR products were purified using a PCR purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA).

**Real-time qPCR.** Quantification of *cdt-V* gene by real-time quantitative PCR (qPCR) was performed as previously described (14). A pGEM-T Easy vector containing a 466-bp fragment of *cdtB* obtained with conventional PCR primers Cdt-up1/Cdt-lp1 (Table 2) was used for the standard curve (14) to quantify the number of *cdt* gene copies in phage DNA by qPCR.

The qPCR assay for *cdt* was a custom TaqMan (Applied Biosystems, Spain) set of primers and probe. The forward qcdtB-UP/LP and qcdt probe with a 6-carboxyfluorescein (FAM) reporter and a nonfluorescent quencher (NFQ) were used under standard conditions in a Step One reverse transcription-PCR (RT-PCR) system (Applied Biosystems, Spain). *cdtB* genes were amplified in a 20-μl reaction mixture using TaqMan environmental real-time PCR master mix 2.0 (Applied Biosystems, Spain). The reaction mixture contained 9 μl of the DNA sample or quantified plasmid DNA. All samples were run in triplicate, along with the standards, positive and negative controls, and the number of genome copies (GC) was the average from the three replicates. A 1:10,000 dilution of positive bacterial DNA was used as a positive control.

Controls were performed to rule out the presence of bacterial or non-encapsidated DNA. After DNase treatment but before desencapsidation, the samples were used as templates for qPCR of *cdt*. Negative results confirmed that all nonviral DNA was eliminated from the sample and that only genes in phage DNA would be detected.

**Isolation of temperate Cdt bacteriophages and preparation of phage lysates.** A 10-ml culture of wild-type strain O157:H7 or of the lysogen of Cdt phage in *S. sonnei* 866 were grown from single colonies in LB broth at 37°C until the exponential growth phase, determined by an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.3 measured using a spectrophotometer (Spectronic 501; Milton Roy, Belgium). For induction experiments, noninduced cultures and cultures induced with mitomycin C (0.5 μg/ml), ciprofloxacin (0.4, 1, or 4 μg/ml), or EDTA (20 mM, pH 7.2) were incubated overnight at 37°C under aerobic conditions with agitation (180 rpm) in the dark. The cultures were centrifuged at 4,000 × g for 10 min, and the supernatants were filtered through low-protein-binding 0.22-μm-pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA).

To evaluate the number of PFU of each phage suspension, each suspension was 10-fold serially diluted. One 1 ml of each dilution was mixed with 1 ml of the host strain (*E. coli* WG5) and 2.5 ml of LB soft agar, poured onto LB agar plates, and incubated as described above.

For electron microscopy and for infectivity studies, phage ΦAA91 (from the O157:H7 wild-type strain) and ΦAA91-ss (from *S. sonnei* 866

TABLE 1 Host range of phage ΦAA91-ss in a collection of *cdt*-negative strains<sup>a</sup>

Host	Strain or serotype	Origin <sup>b</sup>	<i>stx</i> variant	Lysis	Transduction
<i>E. coli</i>	C600	ATCC 23724		–	–
<i>E. coli</i>	DH5α	Invitrogen		–	–
<i>E. coli</i>	O157:H7	ATCC 43888		++	–
<i>E. coli</i>	WG5	ATCC 700078		++	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium	WG49	ATCC 700730		–	–
<i>S. sonnei</i>	866	Clinical		++	+
<i>S. sonnei</i>	30673	Clinical		+	–
<i>S. sonnei</i>	30674	Clinical		++	+
<i>S. sonnei</i>	30676	Clinical		++	+
<i>S. sonnei</i>	30679	Clinical		++	+
<i>S. sonnei</i>	30682	Clinical		++	+
<i>S. flexneri</i>	805-F	Clinical		+	–
<i>E. coli</i>	O111	Clinical		+	–
<i>E. coli</i>	O26	Clinical		–	–
<i>E. coli</i>	O26	Clinical		–	–
<i>E. coli</i>	O157:H7	Clinical	<i>stx</i> <sub>2a</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O4:H4	Clinical	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	++	–
<i>E. coli</i>	O15:H16	Clinical	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O174:H-	Clinical	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	++	–
<i>E. coli</i>	O104:H4	Clinical	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O146:H21	H	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O90:H-	M	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O171:H2	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O171:H2	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O181:H49	C	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	++	–
<i>E. coli</i>	O181:H20	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O2:H25	C	<i>stx</i> <sub>2g</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O136:H1	C	<i>stx</i> <sub>2g</sub>	+	+
<i>E. coli</i>	O90:H-	H	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	ONT:H2	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub> , <i>stx</i> <sub>2d</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O2:H25	C	<i>stx</i> <sub>2g</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O1:H20	C	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O8:H31	C	<i>stx</i> <sub>2g</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O1:H20	C	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O157:H-	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O22:H8	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	+
<i>E. coli</i>	O166:H21	H	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O157:H-	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O156:H8	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	+
<i>E. coli</i>	O1:H20	C	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O171:H2	C	<i>stx</i> <sub>2a</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O76:H2	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	++	–
<i>E. coli</i>	O113:H21	C	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	+	+
<i>E. coli</i>	O100:H-	P	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O171:H2	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O28:H28	C	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	+	+
<i>E. coli</i>	O8:H9	H	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O181:H49	C	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O171:H2	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	ONT:H-	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O2:H25	M	<i>stx</i> <sub>2g</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	ONT:H-	M	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	–	–
<i>E. coli</i>	O22:H8	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	+
<i>E. coli</i>	O157:H7	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O157:H7	C	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	+	–
<i>E. coli</i>	O22:H8	H	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	++	+
<i>E. coli</i>	O1:H20	H	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	–	–

<sup>a</sup> Lytic infection ability was determined by observation of lysis visualized directly on the plate and after hybridization with the *cdtB* probe: +, weak lytic spot; ++, strong lytic spot; –, negative. Transduction ability was evaluated by PCR on colonies obtained after infection with the Cdt phage.

<sup>b</sup> H, strain isolated from raw urban wastewater (human fecal pollution); C, strain isolated from cattle wastewater; P, strain isolated from poultry wastewater; M, strain isolated from mixed animal wastewater.

TABLE 2 Oligonucleotides used in this study<sup>a</sup>

PCR target and primer	Sequence	Size (bp)	Reference or source
<b>Multiplex <i>cdt</i></b>			
CDT-up1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	466	10
CDT-up2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG		10
CDT-lp1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA		10
CDT-lp2	AAATCTCTGCAATCATCCAGTTA		10
<b>qPCR <i>cdt</i></b>			
qcdtB-F	AGGCCGATGAAGTGTGGTCTT	69	14
qcdtB-R	CAATCCGTATGCCAAGCAATGG		14
qcdt-probe	6-FAM-CCGCCACCTTGCCCTT-MGBNFQ		14
<b><i>cdt-VA</i></b>			
c338f	AGCATTAAATAAAAGCACGA	1329	52
c2135r	TACTTGCTGTGGTCTGCTAT		52
<b><i>cdt-VB</i></b>			
c1309f	AGCACCCGAGTATCTTTGA	1363	52
c2166r	AGCCTCTTTATCGTCTGGA		52
<b><i>cdt-VC</i></b>			
P105	GTCAACGAACATTAGATTAT	748	52
c2767r	ATGGTCATGCTTTGTTATAT		52
<b>Integration site left</b>			
attP1	ACAGCGATACATCGTGAAGC	654	This study
attB1	TCATCGGTGTGGAGATATCA		This study
<b>Integration site right</b>			
attP2	GCAATATAATCGCACTGCAA	585	This study
attB2	GAGACAATGCATCGCCTTGT		This study
<b><i>cox</i></b>			
Cox up	ATGGAAGTCAATGACTATGT	273	This study
Cox lp	TCACAACCCCATCCACAAAAG		This study
<b>IS21 within <i>cox</i></b>			
IS21rev	TGCACCGTTGCCCGGCAACC		This study
IS21fw	AGGCATCAGCCGGTATGGA		This study
<b>IS21</b>			
IS21up	GGTTGCCGGGCAACCGTGCA	949	This study
IS21lp	TCCATACCGCTGATGCCT		This study
<b><i>stx</i><sub>2</sub></b>			
stx2-a	GCGGTTTTATTGCAATTAGC	115	53
stx2-b	TCCCGTCAACCTTCACTGTA		53
<b><i>stx</i><sub>2c</sub></b>			
stx2c-a	GCGGTTTTATTGCAATTAGT	124	53
stx2c-b	AGTACTCTTTCCGGCCACT		53
<b><i>stx</i><sub>2d</sub></b>			
stx2d-a	GGTAAATTGAGTTCTCTAAGTAT	175	53
stx2d-b	CAGCAAATCTGAACTGACG		53
<b><i>stx</i><sub>2e</sub></b>			
stx2e-a	ATGAAGTGTATAATGTTAAAGTGGA	303	53
stx2e-b	AGCCACATATAAATATTTCGT		53
<b><i>stx</i><sub>2g</sub></b>			
stx2g-a	GTTATATTTCTGTGGATATC	572	54
stx2g-b	GAATAACCGCTACAGTA		54

<sup>a</sup> MGBNFQ, minor groove binder and nonfluorescent quencher.

lysogen) were isolated from single plaques of lysis obtained from *E. coli* WG5. Plaques isolated from 5 to 10 wells were removed with a wire loop, and each was suspended in 500  $\mu$ l of LB. Suspensions were filtered through low-protein-binding 0.22- $\mu$ m-pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA).

**Isolation of phage DNA.** The phage suspensions were treated with DNase (100 U/ml; Sigma-Aldrich, Spain). After digestion, DNase was heat inactivated (10 min at 80°C). Phage DNA was isolated from the phage lysates by proteinase K digestion and phenol-chloroform extraction as described previously (20). Purified DNA was eluted in a final volume of 50  $\mu$ l of Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA) and evaluated by agarose (0.8%) gel electrophoresis. The bands were viewed following ethidium bromide staining. The concentration and purity of the DNA extracted was determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, DE).

**Preparation of DIG-labeled *cdtB*-specific gene probe.** A 466-bp fragment corresponding to *cdtB* resulting from amplification with primers Cdt-up1/Cdt-lp1 (Table 2) was labeled with digoxigenin (DIG) by incorporating DIG-11-deoxyuridine-triphosphate (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) during PCR as described previously (21) and was used as a probe. The probe was used for hybridization of phages and bacteria by plaque and colony blot assays as previously described (14). Hybridization was performed at 64°C according to standard procedures (20). Stringent hybridization was achieved with the DIG-DNA labeling and detection kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's instructions.

**Infectivity of Cdt phages.** To evaluate the ability of phages  $\Phi$ AA91 and  $\Phi$ AA91-ss to infect bacteria, a 10- $\mu$ l drop of phage suspension, prepared from a single plaque as described above, was spotted onto a monolayer of the host strains tested (Table 1). The monolayer was prepared with 1 ml of log-phase culture (OD<sub>600</sub> of 0.3) of each host strain, mixed with 2.5 ml of LB soft agar (LB broth with 0.7% agar), poured onto LB agar plates, and incubated at 37°C overnight. After incubation, the plaques were transferred to a nylon membrane (Hybond N+; Amersham Pharmacia Biotech, Spain) and hybridized with the *cdtB*-specific probe.

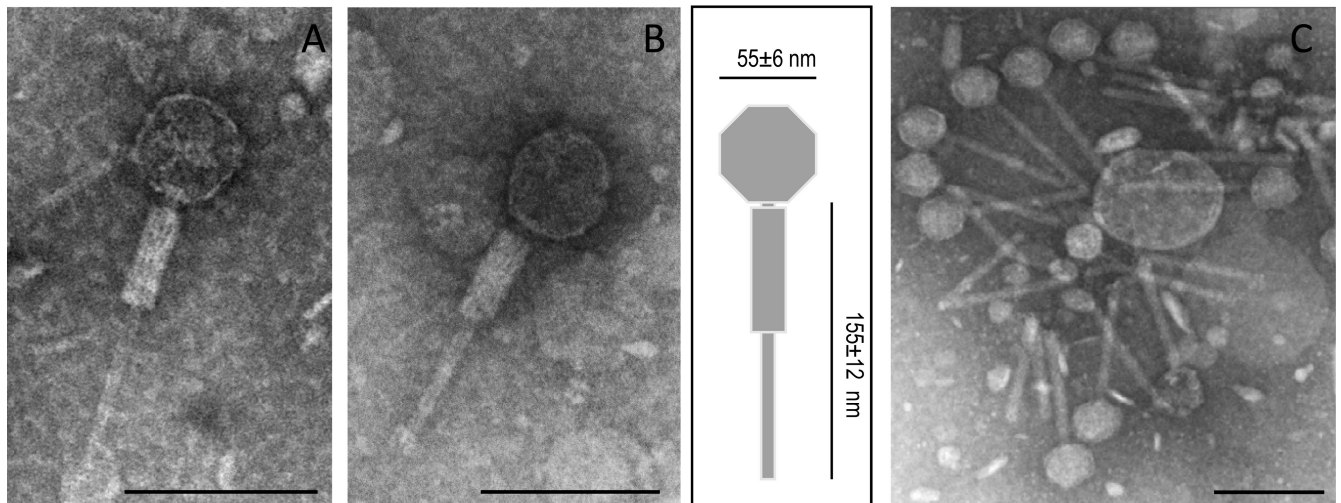
**Generation of *cdt* lysogens.** The bacterial growth from the area of lysis generated by a drop of phage suspension on the agar monolayer of the different host strains (Table 1) was harvested in 1 ml of Ringer 1/4, 10-fold diluted, plated on LB agar, and incubated at 37°C for 18 h. Colonies obtained were evaluated for the presence of *cdt* by colony hybridization assay (14) using the DIG-labeled *cdtB* probe and confirmed by PCR.

**Electron microscopy.** Phages  $\Phi$ AA91 and  $\Phi$ AA91-ss were propagated from a single plaque of lysis obtained from *E. coli* WG5 as described above. The phage suspensions obtained were 100-fold concentrated by means of protein concentrations (100-kDa Amicon Ultra centrifugal filter units; Millipore, Bedford, MA). Both phage suspensions were DNase treated as described above and purified by CsCl centrifugation (20). The easily visible gray band in which the bacteriophages were expected (20, 22), corresponding to a density of 1.45  $\pm$  0.02 g/ml, was collected and dialyzed to remove the CsCl. A drop of phage suspension was deposited on copper grids with carbon-coated Formvar films and stained with 2% KOH phosphotungstic acid (pH 7.2) for 2.5 min. Samples were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope (JEOL USA, Inc.) operating at 80 kV.

**Sequencing of Cdt phage DNA.** The  $\Phi$ AA91-ss phage was purified from an induced culture of the *S. sonnei* lysogen. Phages were purified as described above and concentrated by protein concentrators (Amicon Ultra centrifugal filter units; Millipore, Bedford, MA). The phages present were further purified by CsCl centrifugation as described above. Contaminating bacterial DNA and RNA were removed by additional treatment with DNase (0.3  $\mu$ g/ml) and RNase (0.3  $\mu$ g/ml), and the mixtures were incubated at 37°C for 1 h. Phage DNA was extracted by proteinase K digestion and phenol-chloroform precipitation to a final concentration of 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. The purity and integrity of the DNA were confirmed by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, DE) and 0.8% agarose gel electrophoresis.

Genome sequencing was performed using an Ion Torrent personal genome machine (PGM) (Life Technologies). Libraries were generated using 0.5  $\mu$ g of the genomic DNA and an Ion Xpress Plus fragment library kit comprising the Ion Shear chemistry according to the user guide. After





**FIG 1** Electron micrographs of phage  $\Phi$ AA91 (A) and phage  $\Phi$ AA91-ss (B), corresponding to the *Myoviridae* morphological type. (A and B) Single phage showing the tail with contracted sheath and diagram indicating the size of capsid and tail (in nm). (C) Group of phage  $\Phi$ AA91-ss attached to particles showing the tails noncontracted. Bar, 100 nm.

dilution of each library,  $4.5 \times 10^8$  molecules were used as the templates for clonal amplification on Ion Sphere particles during the emulsion PCR according to the Ion Xpress template 200 kit manual (Life Technologies). The amplification was loaded onto an Ion 316 chip and subsequently sequenced using 105 sequencing cycles according to the Ion Sequencing 200 kit user guide. Approximately 105 sequencing cycles resulted in an average reading length of 182 nucleotides.

Assembly of the sequence was accomplished using CLC Genomic Workbench 6 software. The phage DNA-predicted open reading frames (ORFs) were identified using the GeneMark gene prediction program (<http://exon.gatech.edu>) (23) and ORF Finder ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). These predictions were annotated by comparison to the nonredundant database using BLASTN from the NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) and the European Bioinformatics Institute (UniProtKB/Swiss-Prot). MAUVE software (24) was used to compare  $\Phi$ AA91-ss and other P2 and Cdt phages.

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence of the phage  $\Phi$ AA91-ss genome of this study was submitted to the GenBank database library and assigned accession number [KF322032](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/KF322032).

## RESULTS

**Detection and isolation of Cdt phage  $\Phi$ AA91.** Bacteriophage  $\Phi$ AA91 was isolated from the *cdt*-positive O157:H7 *E. coli* STEC strain that also harbors an inducible Stx phage. In order to characterize the Cdt phage without interference from the Stx phage, it was necessary to mobilize this phage to another susceptible host (14). For this, we used *S. sonnei* strain 866, which did not show the presence of inducible phages under the conditions tested. Following the common procedures for temperate phage induction, phage  $\Phi$ AA91 was isolated after mitomycin C induction of an LB culture of the wild-type strain and purified. Dilutions of the phage suspension were plated on an agar monolayer of the *E. coli* WG5 strain. Lytic plaques formed by phage  $\Phi$ AA91 on *S. sonnei* were clearly lytic and measured  $1.2 \pm 0.2$  mm in diameter.

Assays for the generation of  $\Phi$ AA91 lysogens in several *E. coli* and *Shigella* strains (Table 1) were unsuccessful, except for one lysogen obtained with *S. sonnei* 866. The *cdt*-positive *S. sonnei* 866 lysogen was confirmed by PCR. The lysogen was subcultured three times to confirm its stability, and our observations indicated that

no losses of the phage were observed after subcultivation. Sequencing of the *cdt* variant confirmed that this phage was carrying the *cdt-V* variant of the gene.

**Morphological characterization of phages  $\Phi$ AA91 and  $\Phi$ AA91-ss.** The morphology of phage  $\Phi$ AA91 obtained from O157:H7 strains and of phage  $\Phi$ AA91-ss obtained from *S. sonnei* lysogen were examined using a phage suspension obtained after propagating a single lytic plaque and CsCl purification. Both phages had identical *Myoviridae* morphology (22), with a capsid measuring  $55 \pm 6$  nm in diameter and a contractile tail of  $155 \pm 12$  nm (Fig. 1).

**Induction of phage  $\Phi$ AA91-ss.** To determine whether *cdt* was located in the genome of an inducible prophage, infectious phages and viral genomes were counted without induction and after induction from *S. sonnei* lysogen with mitomycin C, ciprofloxacin, and EDTA at various times. Induction was also measured by a reduction of the OD<sub>600</sub> of the bacterial culture, which indicates activation of the lytic cycle of induced prophages (Fig. 2).

The infectious particles or GC of the phage showed no significant increase ( $P > 0.05$  by analysis of variance [ANOVA]) between the noninduced lysogenic strain culture and the culture treated with the inducing agents. After 18 h, a significantly ( $P < 0.05$ ) lower OD<sub>600</sub> was observed in the culture treated with ciprofloxacin (Fig. 2, upper table). However, this reduction was probably not due to the induction of  $\Phi$ AA91-ss, as observed after evaluation of the number of infectious phages by plaque assay (Fig. 2, left) or after evaluation of *cdt* GC in phage DNA (Fig. 2, right).

These results indicated that phage  $\Phi$ AA91-ss is not inducible through the previously described methods; rather, it appears to be self-inducible. Reduction of OD<sub>600</sub> after ciprofloxacin exposure could be attributable to a decrease in the number of cells by the antimicrobial agent, since it was used at a high concentration. Lower concentrations of ciprofloxacin tested (0.4 and 1  $\mu$ g/ml) did not show induction of  $\Phi$ AA91-ss. Subsequent evaluation of the number of  $\Phi$ AA91 particles from the wild-type *E. coli* O157:H7 strain confirmed that, as observed for the *Shigella* lyso-



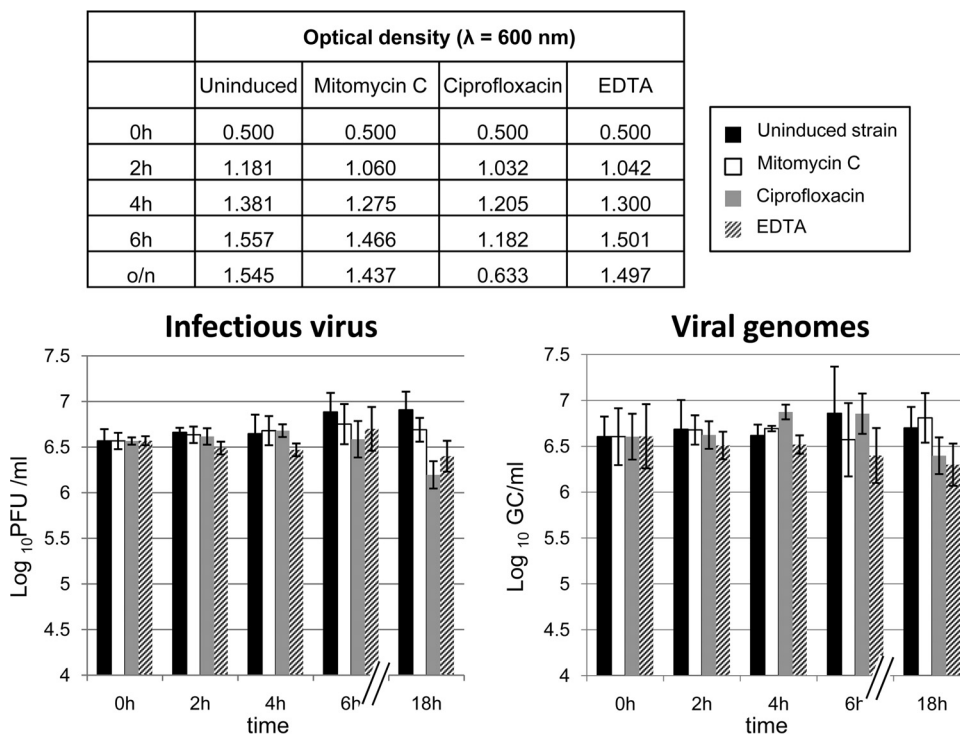


FIG 2 Induction experiments of phage  $\Phi$ AA91-ss using mitomycin, ciprofloxacin, and EDTA. Monitoring of induction was performed by spectrophotometry at a wavelength of 600 nm (upper table), infectiveness on *E. coli* WG5 in  $\log_{10}$  PFU/ml (chart on the left), and evaluation of phage genomes by qPCR in  $\log_{10}$  GC/ml (chart on the right).

gen, the number of phages did not differ significantly between noninduced and induced cultures (data not shown).

**Host range of phages  $\Phi$ AA91 and  $\Phi$ AA91-ss.** Each phage, isolated from a single plaque, was used to infect a collection of 57 strains, including one *Salmonella* strain, one *Shigella flexneri* strain, five *S. sonnei* strains, several *E. coli* laboratory strains, and wild-type STEC strains of different serotypes. Phages  $\Phi$ AA91 and  $\Phi$ AA91-ss had the same host range and caused clear lysis in 34 of the strains (Table 1). From these, phage  $\Phi$ AA91 generated only one lysogen in *S. sonnei* 866. In contrast, phage  $\Phi$ AA91-ss generated lysogens in 13 strains of different bacterial genera (Table 1).

**Sequence of phage  $\Phi$ AA91-ss.** Phage  $\Phi$ AA91-ss has a genome of 33,628 bp. Annotation of the phage genome showed multiple characteristics of P2 bacteriophages, although it also displayed some differences. The sequence is presented as a linear structure terminating with the cohesive ends (Table 3 and Fig. 3) and starting with *cosL* (left cohesive end). The first identified ORF is a capsid portal protein and is followed by a set of head synthesis proteins. Downstream of the capsid genes are the genes related to lysis (holin, lysozyme, and lysins A and B) (Table 3 and Fig. 3). The next set of genes corresponds to those proteins involved in tail and baseplate synthesis. Downstream are the genes involved in lysogeny (*int*, *C*, and expected *cox*). The phage attachment site (*attP*) (Fig. 3) is located between *ogr* (a positive regulatory factor required for P2 late gene transcription) (25) and the gene encoding integrase (*int*). The product of gene *C* is the repressor that regulates the lysogenic state. The next expected gene would be *cox*, encoding a multifunctional protein of 91 amino acids (26). However, in phage  $\Phi$ AA91-ss, the *cox* gene is truncated by insertion of a long element, IS21, composed of two ORFs that encode a trans-

posase and a transposition protein, respectively. We will devote more attention to this element in the next section. The sequence continues with ORFs identified as DNA replication proteins, particularly gene *A*, encoding gpA, which initiates replication by inducing a single-stranded cut at the origin of replication (*ori*) (5'-GCGCCTCGGAGTCCTGTCAA-3') (Fig. 3) (27). Finally, we found the *cdt* operons (*C*, *B*, and *A*), which appeared downstream from gene *A* and upstream from *cosR*, at the right cohesive end of the phage genome.

**Determination of IS21 in the host strains.** Many insertion elements have been identified in *Shigella* and *E. coli* located on a plasmid or in the chromosome. To determine whether the presence of IS21 in phage  $\Phi$ AA91-ss was a product of rearrangements after lysogenizing the *S. sonnei* strain 866 or whether it was originally present in the phage in the wild-type O157:H7 *E. coli* strain, we used PCR to evaluate the fragment between the first part of *cox* and the IS21 element and the fragment comprising the last fragment of IS21 and the last *cox* fragment. In addition, we investigated whether the element is maintained in some *S. sonnei* strains of our collection in which the phage  $\Phi$ AA91-ss generated new lysogens (Table 1). We amplified both segments using the primers described in Table 2 (Fig. 4). If the IS21 element is present within *cox*, amplification using the combination of primers *cox*-up and S21rev would result in an amplicon of 610 bp, while the combination of primers IS21fw and *cox*-lp would result in a fragment of 890 bp. Amplification of both regions confirmed the location of the IS21 element within *cox* in phage  $\Phi$ AA91-ss from the *S. sonnei* 866 lysogen as well as from other *S. sonnei* lysogens (30676 and 30682; Table 1), as shown in Fig. 4. However, when looking at the

TABLE 3 Annotation of ORFs detected in the phage  $\Phi$ AA91-ss genome

ORF	Position (bp)	Size (bp)	Description	% Cover query <sup>a</sup>	% Identity <sup>a</sup>	Organism	NCBI protein accession no.
	1–19	19	<i>cosL</i> ; left cohesive end				
1	189–1223	1,035	Gene Q; capsid portal	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_000038198.1
2	1223–2995	1,773	Gene P; large terminase subunit	100	100	<i>Yersinia</i> phage	NP_839851.1
3	3169–4023	855	Gene O; capsid scaffold	100	99	Prophage P2 in <i>E. coli</i>	YP_002391908.1
4	4082–5155	1,074	Gene N; major capsid protein precursor	100	100	Prophage P2 in <i>E. coli</i>	WP_001248540.1
5	5159–5902	744	Gene M; small terminase subunit	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_000203437.1
6	6002–6511	510	Gene L; capsid completion protein	100	100	<i>E. coli</i> prophage	YP_001746272.1
7	6511–6714	204	Gene X; essential tail protein	100	100	P2-like prophage in <i>E. coli</i>	YP_005277372.1
8	6718–6999	282	Gene Y; holin	100	100	Phage P2	NP_046764.1
9	6999–7496	498	Gene K; lysozyme	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_000123122.1
10	7511–7936	426	Lysin A	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_000736580.1
11	7924–8349	426	Lysin B	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_000040681.1
12	8454–8924	471	Gene R; essential tail completion protein	100	100	Phage P2	WP_001367960.1
13	8917–9369	453	Gene S; essential tail completion protein	100	100	<i>Yersinia</i> phage	NP_839862.1
14	9436–10071	636	Gene V; baseplate protein	100	100	Phage P2	WP_001093710.1
15	10068–10415	348	Gene W; putative baseplate protein	100	100	<i>E. coli</i> prophage	YP_002391893.1
16	10420–11328	909	Gene J; baseplate assembly	100	99	<i>E. coli</i> prophage	WP_001121491.1
17	11321–11851	531	Gene I; baseplate assembly	100	100	Phage P2	NP_046774.1
18	11862–13940	2,079	Gene H; tail fiber	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_000104689.1
19	13944–14471	528	Gene G; putative tail fiber assembly	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_001164103.1
20	14571–15677	1,107	Hypothetical protein	100	100	<i>E. coli</i>	WP_000382496.1
21	15979–17169	1,191	Gene FI; major tail sheath	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_001286731.1
22	17182–17700	519	Gene FII; major tail tube	100	100	Phage P2	NP_046779.1
23	17757–18032	276	Gene E; tail protein	100	100	<i>E. coli</i> Mu-like prophage	WP_001031311.1
24	18177–20624	2,448	Gene T; tail length determinant	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_000069913.1
25	20639–21118	480	Gene U; tail protein	100	100	Phage P2	WP_000978923.1
26	21118–22281	1,164	Gene D; phage late control	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_001704948.1
27	22362–22580	219	<i>ogt</i> ; activator of late transcription; Att phage integration site	100	100	<i>E. coli</i>	WP_000280530.1
28	22853–23863	1,011	Integrase	100	100	<i>E. coli</i> phage HP1	WP_001336827.1
29	23903–24196	294	Gene C; immunity control	100	100	<i>E. coli</i> prophage	YP_005280060.1
	24349–24471	123	Truncated <i>cox</i> gene				
30	24553–25725	1,173	IstA; IS21 transposase	100	100	<i>S. sonnei</i>	YP_309050.1
31	25725–26522	798	IstB; IS21 transposition protein	100	100	<i>S. sonnei</i>	YP_309051.1
	26581–26758	177	Truncated <i>cox</i> gene				
32	26922–27428	507	Gene B; DNA replication protein	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_000426197.1
33	27492–27716	225	Hypothetical protein (similar to phage P2 ORF 80)	100	100	<i>E. coli</i>	YP_001746256.1
34	27716–28018	303	Hypothetical protein (similar to phage P2 ORF 81)	100	100	<i>E. coli</i>	WP_001277965.1
35	28018–28242	225	Zinc finger protein (similar to phage P2 ORF 82)	100	100	Phage P2	NP_046793.1
36	28239–28514	276	Replication initiation protein (similar to phage P2 ORF 83)	100	100	<i>E. coli</i> prophage	YP_852002.1
37	28504–30801	2,298	Gene A; DNA replication	100	100	<i>E. coli</i> prophage	WP_000268595.1
38	30877–31422	546	Cdt-V C operon	100	100	<i>E. coli</i>	WP_000825552.1
39	31437–32246	810	Cdt-V B operon	100	100	<i>E. coli</i> Vir plasmid	YP_003034080.1
40	32243–33019	777	Cdt-V A operon	100	100	<i>E. coli</i>	WP_001284793.1
	33609–33628	19	<i>cosR</i> ; cohesive end				

<sup>a</sup> Percentage of coverage and the closest identity to proteins as described in the NCBI databank.

original *E. coli* O157:H7 strain 91, where phage  $\Phi$ AA91 was present, we found that *cox* appeared intact.

PCR showed that the IS21 element was present in the *S. sonnei* strains but not in the wild-type O157:H7 strain, although phage  $\Phi$ AA91 was present, confirming that incorporation of IS21 occurred after lysogenization in *S. sonnei*.

To evaluate the percentage of phages that could harbor the IS21 element, phage  $\Phi$ AA91, induced from *E. coli* O157:H7 strain 91, and phage  $\Phi$ AA91-ss, from *S. sonnei* 866 lysogen, were plated using *E. coli* WG5 as the host strain (negative for IS21). Plates containing between 20 and 50 plaques were used to isolate phages from the plaques of lysis. Phage DNA was extracted from the

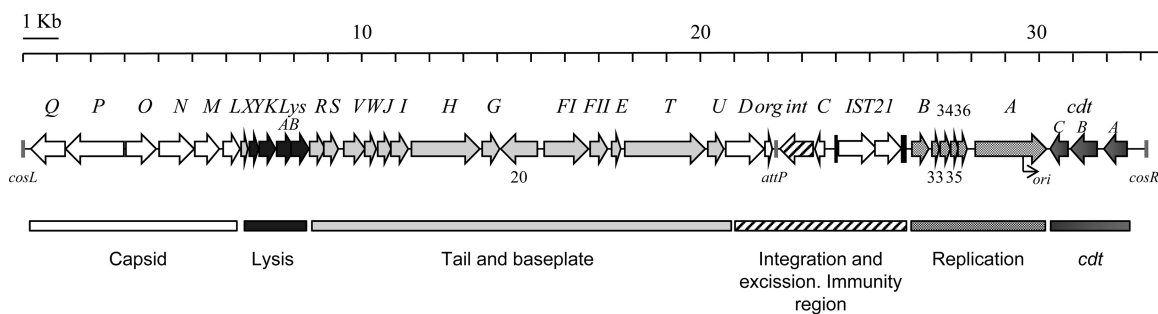


FIG 3 Genetic map of phage ΦAA91-ss. Relevant phage genes, identified by comparison to other P2-like phages, are indicated. Arrows show gene size, orientation, and context. Those ORFs without defined function are shown by ORF number. The scale (in kb) is indicated in the upper part of the figure. The origin of replication (*ori*), the cohesive ends (*cosR* and *cosL*), and the phage attachment site (*attP*) are indicated.

plaques, and the presence of IS21 within *cox* was evaluated by PCR amplification of the IS21 left and right insertion sites and those with intact *cox* gene by using primers *cox-up/lp*. The results of phage ΦAA91 induced from O157:H7 showed that 100% of plaques had the intact *cox* gene and that the IS21 element was absent. Results of plaques of ΦAA91-ss phages induced from *S. sonnei* 866 lysogen showed that 86.1% ( $\pm 3.2\%$ ) of the plaques contained IS21 inserted within *cox*, while only 13.9% ( $\pm 3.2\%$ ) presented intact *cox* and no IS21 element. The higher proportion of phages carrying IS21 is consistent with the sequence obtained. Phages induced from lysogens in *S. sonnei* strains 30676 and 30682 with phage ΦAA91-ss showed 100% of the plaques of lysis with the IS21 element and *cox* truncated, suggesting that lysogens were obtained by incorporation of ΦAA91-ss.

**Determination of sequence similarity between ΦAA91 and ΦAA91-ss.** Using the ΦAA91-ss sequence as the template, we designed PCR primers that allowed the amplification of 30 consecutive fragments of ca. 1,200 bp each (data not shown). Each fragment amplified overlapped the previous and the following fragment, covering the whole length of the genome of phage ΦAA91-ss (33,628 bp). These primers were used to amplify the

ΦAA91 DNA obtained from a single plaque, and ΦAA91-ss DNA was used as a control.

The sizes of the 30 fragments obtained were identical for both phages, except in three fragments (23, 24, and 25) (data not shown), in which at least one of the primers annealed with the IS21 fragment; therefore, no amplimers were obtained with phage ΦAA91 DNA, but they were obtained with ΦAA91-ss. Although minor variations in the sequence cannot be excluded, these results strongly indicated that compared to the genetic organization of the ΦAA91 genome, the ΦAA91-ss genome has been modified only in the *cox* gene by the incorporation of IS21.

**Homology with other P2-like phages.** Comparison of the ΦAA91-ss phage genome to those of other P2 and Cdt phages showed different similarities. The most similar was the *Enterobacteriaceae* P2 phage carrying *cdt-V* (KC618326.1) (12); 79% of the sequence was 98% identical. The second most similar phage, with a similarity of 97% in 75% of its genome, was phage WPhi (AY135739.1) of *E. coli*. Finally, phage LC-413 (AY251033.1) of *Yersinia* showed 73% coverage with 96% similarity, and phage P2 (AF063097.1) of *E. coli* showed 69% coverage with 100% similarity in the covered sequence. Some bacterial genomes also showed

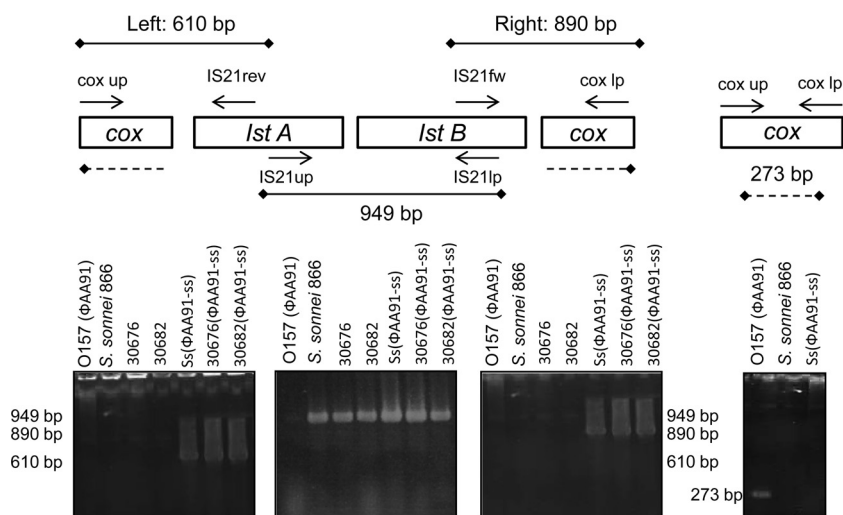


FIG 4 Amplimers generated for detection of IS21 element in phages and host strains. Insertion of IS21 in *cox* was detected from its left and right side by the combination of IS21/*cox* primers. The element was detected in *Shigella* (results of *S. sonnei* strains 866, 30676, and 30682 are shown here) but not in the wild-type O157:H7 *E. coli* strain. A nontruncated *cox* gene was observed only in the wild-type O157:H7 *E. coli* strain.

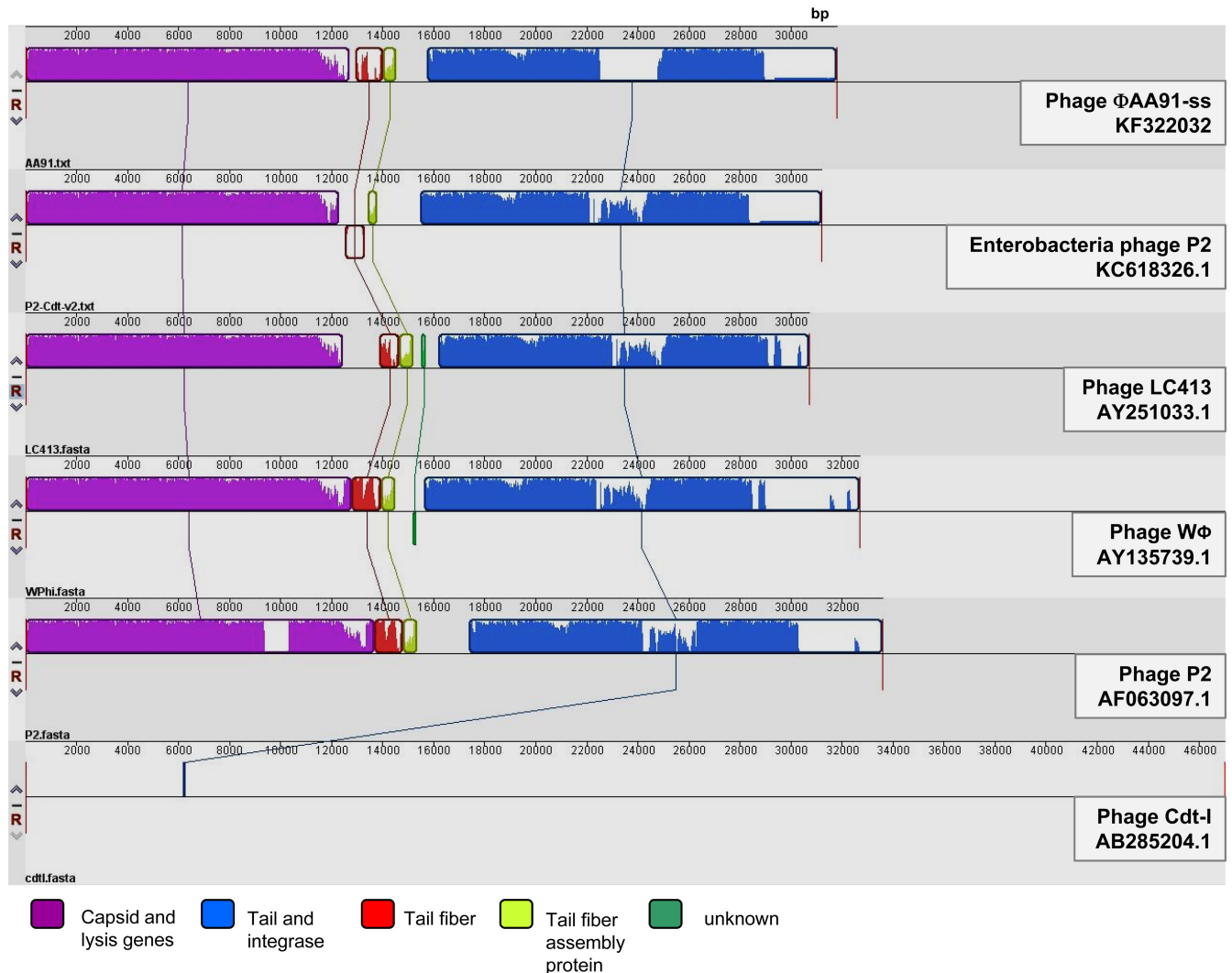


FIG 5 MAUVE analysis comparison of Cdt phage  $\Phi$ AA91-ss to P2-like phages (P2, LC413, and W $\Phi$ ) and genomes of Cdt phages (P2-Cdt-V and Cdt-I).

similarity to the  $\Phi$ AA91-ss phage genome. The most similar, with 84% of coverage with 100% identity, was *S. sonnei* strain 53G (HE616528.1). However, this sequence has not been annotated, hence it is not known whether this strain harbors a prophage. However, it does lack *cdt*, since the area of coverage did not include the *cdt* operon. A similarity of 99% in 83% of the sequence was observed for *E. coli* strain SMS-3-5 (CP000970.1), and 99% identity in 75% of the sequence was found with other *E. coli* W genomes (CP002185.1, CP002967.1, CP002516.1, and CP002970.1), all of them harboring a P2-like phage in which the *cdt* operon is absent. Other phages or bacterial strains showed lower coverage.

Progressive MAUVE analysis (24) (Fig. 5) allowed comparison of phage  $\Phi$ AA91-ss to complete sequences of P2-like phages showing similarity and to the two Cdt phages in the databases: phage encoding Cdt-I (15) and a P2 cryptic prophage encoding Cdt-V (12) (accession number KC618326.1). The results show that despite the differences in their sequences, all phages shared regions in their genome's structure, with the exception of phage encoding Cdt-I, which has a completely different genome. In the

remaining phages, two main structures were observed, one comprising capsid genes and the genes involved in lysis (holins and lysins) and a second set comprising genes involved in the phage tail and the integrases. Some other regions encoding tail fiber or tail assembly proteins presented greater degrees of variability than the previously mentioned regions (Fig. 5).

**Insertion site of phage  $\Phi$ AA91-ss.** The *att* site of phage  $\Phi$ AA91-ss is located between the *ogr* and *int* genes (Fig. 3). Its integration into the *S. sonnei* 866 lysogen was determined by designing primers attP1 and attP2 in both genes of phage DNA (Table 1) and combining these with primers attB1 and attB2 located in the *fieF* and *cpXP* genes, which were previously described as the insertion site of P2-like phages in *E. coli* W, *E. coli* K KO11FL (28), and *S. sonnei* 53G (accession number HE616528.1). Amplification of attP1/B1 and attB2/P2 showed amplicons of 654 and 585 bp, respectively, corresponding to the expected size and confirming that the phage was inserted into this bacterial site. The *S. sonnei* 866 strain used as a control did not show amplification at both sites. Moreover,  $\Phi$ AA91-ss also is inserted in the same locus in lysogens of *S. sonnei* strains 30676 and 30682. Controls of bacterial



strains without the phage were negative. Additionally, we obtained the same PCR results when testing phage  $\Phi$ AA91 insertion in the *E. coli* O157:H7 wild-type strain. Thus, we concluded that  $\Phi$ AA91 and  $\Phi$ AA91-ss are inserted in the same locus in their respective host strains.

## DISCUSSION

P2-like prophages seem to be quite common in *E. coli* but also seem to be distributed among other proteobacteria of the gamma subgroup (29). The genomes of phages HP1 and HP2 in *Haemophilus influenzae* (30),  $\Phi$ CTX in *Pseudomonas aeruginosa* (31), and K139 in *Vibrio cholerae* (32) have all been sequenced and shown to be P2-like with respect to genome organization as well as nucleotide sequence. Phages PSP3 in *Salmonella enterica* serovar Potsdam (33) and SopE $\Phi$  in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (34) are also P2-like. Bacterial genome sequencing projects have revealed additional P2-like prophages, for example, Sp13 in the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain isolated during the Sakai outbreak in Japan (35).

In our previous study (14), *cdt-V* was found in an inducible Cdt bacteriophage. The presence of *cdt* in phages, although not always inducible, has been reported (11) and is supported by the P2 sequences (12) or lambdoid phage sequences (15) found in the flanking regions of *cdt* in several bacterial isolates. In this study, a new Cdt-V phage, named  $\Phi$ AA91, was used to lysogenize *S. sonnei* strain 866, since this strain gave good results in studies with Cdt phages (14) and also had previously shown the capacity to generate lysogens of temperate Stx bacteriophages (21, 36). No lysogens of  $\Phi$ AA91 were obtained with any of the other laboratory strains assayed. Since the phage induced from the *S. sonnei* strain was shown to be different from the phage induced from the *E. coli* wild type, it was renamed  $\Phi$ AA91-ss.

Phages  $\Phi$ AA91 and  $\Phi$ AA91-ss are self-inducible, or at least lead to no increase in the number of infectious viruses or viral genome copies when using common phage-inducing agents (37–40). This can be attributed to the fact that these phages belong to the P2-like family of phages. In P2 phages, the product of gene C, which is responsible for lysogeny, cannot be cleaved by the RecA protease (41, 42). For this reason, this gene is not affected by UV or other inducing agents, causing derepression of the lysogenic state. Therefore, P2-like phages do not promote their lytic pathway when using one of the common inducing agents; rather, they maintain the same levels of induction in the absence of these agents. This lack of inducibility was previously observed for another phage harboring Cdt (phage  $\Phi$ 125) (14).

The remarkable difference between the genomes of phages  $\Phi$ AA91 and  $\Phi$ AA91-ss is the IS21 insertion element. Insertion elements are numerous in *E. coli* and *Shigella* genomes and are capable of causing many kinds of DNA rearrangements (43). Deletions as well as translocations and inversions are likely the result of the copious numbers of insertion sequence elements in bacterial chromosomes. This element is inserted within the *cox* gene, encoding Cox, which is responsible for inhibiting phage integration and activating phage DNA excision. In P2 phages, by leading to excision of P2 DNA out of the host chromosome, Cox is directly involved in the site-specific recombination event (44). Early expression of *cox* ensures that at least a few copies of the P2 genome are synthesized free of the host chromosome (44). However, a mutation in *cox* will produce a phage that is as efficient as or more efficient than the parental strain in the generation of lysogens.

This phage would be able to recombine with higher frequency (5 to 20 times), at least in the *att* region pathway (45). Successful generation of lysogens with  $\Phi$ AA91-ss in other hosts also could be attributable to its potentially higher recombination ability after *cox* truncation compared to the original phage,  $\Phi$ AA91. This could not be properly assayed, since with the original phage, only one *S. sonnei* lysogen of  $\Phi$ AA91 was obtained, and the phage induced from this strain ( $\Phi$ AA91-ss) already carried IS21.

IS21 has not been found in the wild-type *E. coli* O157:H7 strain containing phage  $\Phi$ AA91; therefore, it must have been incorporated into the phage genome during lysogenization of the *Shigella* strain in which this element is present and subsequently is maintained in the phage, since it was found in some lysogens generated *a posteriori* with phage  $\Phi$ AA91-ss. The IS21 element has been reported to be located close to a *cdt-III* gene in a pVir plasmid in *E. coli* (46) but is present in a different position and with the opposite orientation. IS21 has also been found in P2-like phage  $\Phi$ CTX in *Pseudomonas aeruginosa* (31) but without the *cdt* operon. The insertion of IS21 during the generation of *Shigella* lysogens provides experimental evidence of the evolution of phages after the lysogenization of new hosts, as widely reported, mostly by comparison of different phage genomes (47, 48).

The genes encoding Cdt were found inserted into a region of the phage (named TO) that has been identified as a hot spot for the insertion of foreign genes (49). The gene content of the TO region varies extensively among P2-like prophages found in *E. coli* (49, 50). A previous sequence of a prophage harboring the *cdt* operon indicates the same insertion site of the genes (12).

Phages  $\Phi$ AA91 and  $\Phi$ AA91-ss showed the morphology of *Myoviridae* and, like other P2-like phages, are transducing phages (51). In our previous studies with another Cdt-V phage, phage  $\Phi$ 125 (14), the phage showed *Siphoviridae* morphology, and no phages with *Myoviridae* morphology were observed. *Siphoviridae* morphology has also been reported for the Cdt-1 $\Phi$  phage described by Asakura et al. (15). However, the *cdt-V* operon in phage  $\Phi$ 125 was flanked by a bacteriophage region showing homology with a fragment of a P2 phage. Similarly, homology with P2 in the flanking regions of the *cdt-V* cluster has been widely reported (11, 12, 18). Whether these previously reported phages belonged to the P2 family or were the product of recombination of these and other phages of the *Siphoviridae* group remains unknown. On the contrary, descriptions of the *cdt-I* and *cdt-IV* flanking sequences indicate that these are not always related to P2 phage genes (11, 15). In fact, variability among Cdt phages is not surprising considering the demonstrated ability of phages to interchange different fragments of diverse origin mediated by both homologous and non-homologous recombination (48). The presence of P2-like phages in different genera (*Vibrio*, *Salmonella*, and *E. coli*, for example) is also coincident with the wide distribution of *cdt* genes in all of these genera.

The phage in this study is a good example that shows not only the ability of phages to generate new strains, in this case by the incorporation of *cdt*, but also the evolution of phages when moving from one strain to another, which can cause the generation of phage variants able to convert strains in a more successful way. It is of clinical importance to gain more insights into the *in vivo* dissemination of virulence factors by means of bacteriophages in enteric infections, particularly within the intestinal tract, where phages can spread through a wide range of hosts and cause the emergence of new pathogenic bacteria.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2009-07576 and AGL2012-30880), the RecerCaixa program (Fundació Obra Social La Caixa), and the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB). Anna Allué has received grant FI from the Generalitat de Catalunya, Catalonia, Spain.

## REFERENCES

- Ohara M, Oswald E, Sugai M. 2004. Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. *J. Biochem.* 136:409–413.
- Oswald E, Nougayrède JP, Taieb F, Sugai M. 2005. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:83–91.
- Ge Z, Schauer DB, Fox JG. 2008. *In vivo* virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol.* 10:1599–1607.
- Boesze-Battaglia K, Besack D, McKay T, Zekavat A, Otis L, Jordan-Sciutto K, Shenker BJ. 2006. Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol.* 8:823–836.
- Smith JL, Bayles DO. 2006. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* 32:227–248.
- Pickett CL, Whitehouse CA. 1999. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol.* 7:292–297.
- Thelestam M, Frisan T. 2004. Cytolethal distending toxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152:111–133.
- Okuda J, Kurazono H, Takeda Y. 1995. Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb. Pathog.* 18:167–172.
- Pérés SY, Marchès O, Daigle F, Nougayrède JP, Herault F, Tasca C, De Rycke J, Oswald E. 1997. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* 24:1095–1107.
- Tóth I, Héraul F, Beutin L, Oswald E. 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.* 41:4285–4291.
- Tóth I, Nougayrède JP, Dobrindt U, Ledger TN, Boury M, Morabito S, Fujiwara T, Sugai M, Hacker J, Oswald E. 2009. Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 77:492–500.
- Svab D, Horvath B, Maroti G, Dobrindt U, Toth I. 2013. Sequence variability of P2-like prophage genomes carrying the cytolethal distending toxin V operon in *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:4958–4964.
- Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt MA, Karch H. 2004. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect. Immun.* 72:1812–1816.
- Allué-Guardia A, Garcia-Aljaro C, Muniesa M. 2011. Bacteriophage-encoding cytolethal distending toxin type V gene induced from nonclinical *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.* 79:3262–3272.
- Asakura M, Hinenoya A, Alam MS, Shima K, Zahid SH, Shi L, Sugimoto N, Ghosh AN, Ramamurthy T, Faruque SM, Nair GB, Yamasaki S. 2007. An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:14483–14488.
- Allué-Guardia A, Jofre J, Muniesa M. 2012. Stability and infectivity of cytolethal distending toxin type V gene-carrying bacteriophages in a water mesocosm and under different inactivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5818–5823.
- Cangelosi GA, Freitag NE, Buckley MR. 2004. From outside to inside. environmental microorganisms as human pathogens. *American Academy of Microbiology report.* ASM, Washington, DC.
- Friedrich AW, Lu S, Bielaszewska M, Prager R, Bruns P, Xu JG, Tschäpe H, Karch H. 2006. Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J. Clin. Microbiol.* 44:1844–1846.
- Bielaszewska M, Stoewe F, Fruth A, Zhang W, Prager R, Brockmeyer J, Mellmann A, Karch H, Friedrich AW. 2009. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *J. Clin. Microbiol.* 47:2061–2066.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Muniesa M, Blanco JE, De Simón M, Serra-Moreno R, Blanch AR, Jofre J. 2004. Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* 150:2959–2971.
- Franki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, suppl 2. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
- Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. 2001. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Res.* 29:2607–2618.
- Darling AE, Mau B, Perna NT. 2010. ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* 5:e11147. doi:10.1371/journal.pone.0011147.
- Christie GE, Haggård-Ljungquist E, Feiwel R, Calendar R. 1986. Regulation of bacteriophage P2 late-gene expression: the *ogr* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:3238–3242.
- Haggård-Ljungquist E, Kockum K, Bertani LE. 1987. DNA sequences of bacteriophage P2 early genes *cox* and *B* and their regulatory sites. *Mol. Gen. Genet.* 208:52–56.
- Liu Y, Haggård-Ljungquist E. 1994. Studies of bacteriophage P2 DNA replication: localization of the cleavage site of the A protein. *Nucleic Acids Res.* 22:5204–5210.
- Turner PC, Yomano LP, Jarboe LR, York SW, Baggett CL, Moritz BE, Zentz EB, Shanmugam KT, Ingram LO. 2012. Optical mapping and sequencing of the *Escherichia coli* KO11 genome reveal extensive chromosomal rearrangements, and multiple tandem copies of the *Zymomonas mobilis* *pdc* and *adhB* genes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39:629–639.
- Nilsson AS, Karlsson JL, Haggård-Ljungquist E. 2004. Site-specific recombination links the evolution of P2-like coliphages and pathogenic enterobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 21:1–13.
- Esposito D, Fitzmaurice WP, Benjamin RC, Goodman SD, Waldman AS, Scocca JJ. 1996. The complete nucleotide sequence of bacteriophage HP1 DNA. *Nucleic Acids Res.* 24:2360–2368.
- Nakayama K, Kanaya S, Ohnishi M, Terawaki Y, Hayashi T. 1999. The complete nucleotide sequence of FCTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal transfer via bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 31:399–419.
- Nesper J, Blass J, Fountoulakis M, Reidl J. 1999. Characterization of the major control region of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139: immunity, exclusion, and integration. *J. Bacteriol.* 181:2902–2913.
- Bullas LR, Mostaghimi AR, Arensdorf JJ, Rajadas PT, Zuccarelli AJ. 1991. Salmonella phage PSP3, another member of the P2-like phage group. *Virology* 185:918–921.
- Mirolid S, Rabsch W, Tschäpe H, Hardt WD. 2001. Transfer of the Salmonella type III effector *sopE* between unrelated phage families. *J. Mol. Biol.* 312:7–16.
- Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurakawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 8:11–22.
- Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M. 2007. Insertion site occupancy by stx2 bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J. Bacteriol.* 189:6645–6654.
- Imamovic L, Muniesa M. 2012. Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS One* 7:e32393. doi:10.1371/journal.pone.0032393.
- Livny J, Friedman DI. 2004. Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Mol. Microbiol.* 51:1691–1704.
- Fuchs S, Mühldorfer I, Donohue-Rolfé A, Kerényi M, Emödy L, Alexiev R, Nenkov P, Hacker J. 1999. Influence of RecA on *in vivo* virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb. Pathog.* 27:13–23.
- Kimmit PT, Harwood CR, Barer MR. 2000. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg. Infect. Dis.* 6:458–465.

41. Lundqvist B, Bertani G. 1984. Immunity repressor of bacteriophage P2. Identification and DNA-binding activity. *J. Mol. Biol.* **178**:629–651.
42. Bertani LE, Six EW. 1988. The P2-like phages and their parasite, P4, p 73–143. *In* Calendar R (ed), *The bacteriophages*, vol 2. Plenum Press, New York, NY.
43. Yang F, Yang J, Zhang X, Chen L, Jiang Y, Yan Y, Tang X, Wang J, Xiong Z, Dong J, Xue Y, Zhu Y, Xu X, Sun L, Chen S, Nie H, Peng J, Xu J, Wang Y, Yuan Z, Wen Y, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Hou Y, Yu J, Jin Q. 2005. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Res.* **33**:6445–6458.
44. Saha S, Haggård-Ljungquist E, Nordström K. 1987. The cox protein of bacteriophage P2 inhibits the formation of the repressor protein and autoregulates the early operon. *EMBO J.* **6**:3191–3199.
45. Lindahl G, Sunshine M. 1972. Excision-deficient mutants of bacteriophage P2. *Virology* **49**:180–187.
46. Johnson TJ, DeRoy C, Belton S, Williams ML, Lawrence M, Nolan LK, Thorsness JL. 2010. Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* **144**:100–109.
47. Hendrix RW, Smith MCM, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:2192–2197, 1999.
48. Hendrix RW. 2003. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:506–511.
49. Nilsson AS, Haggård-Ljungquist E. 2007. Evolution of P2-like phages and their impact on bacterial evolution. *Res. Microbiol.* **158**:311–317.
50. Odegrip R, Nilsson AS, Haggård-Ljungquist E. 2006. Identification of a gene encoding a functional reverse transcriptase within a highly variable locus in the P2-like coliphages. *J. Bacteriol.* **188**:1643–1647.
51. Nilsson AS, Haggård-Ljungquist E. 2006. The P2-like bacteriophages, p 365–390. *In* Calendar R (ed), *The bacteriophages*. ASM Press, Washington, DC.
52. Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, Karch H. 2003. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect. Immun.* **71**:3634–3638.
53. Wang G, Clark CG, Rodgers FG. 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3613–3619.
54. Leung PH, Peiris JS, Ng WW, Robins-Browne RM, Bettelheim KA, Yam WC. 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7549–7553.





## **4. DISCUSIÓN GENERAL**



La toxina Cdt es un factor de patogenicidad descubierto a finales de los años 80 (Johnson y Lior, 1988), que bloquea el ciclo celular eucariota antes de llegar a la fase de mitosis. Hasta la fecha se sabe que pertenece al grupo de toxinas AB<sub>2</sub>, aunque se desconoce el mecanismo exacto de acción (a qué receptores se une o cuáles son las vías de señalización que activa), y han sido descritas cinco variantes (Cdt-I a Cdt-V). Poca es la información que se tiene sobre los mecanismos de patogenicidad de esta toxina “*in vivo*”, el papel que desempeña en la virulencia de una cepa y la epidemiología, su presencia en el medio ambiente o la forma en que se moviliza de una cepa a otras. Estos dos últimos aspectos, la prevalencia medioambiental y la movilización por transducción mediada por fagos, han centrado el trabajo desarrollado en esta tesis. La tesis es el resultado de un proyecto nacional sobre la movilidad de factores de virulencia en *E. coli* patogénicas y su prevalencia ambiental.

En este trabajo se ha confirmado la transducción del gen *cdt* por un proceso de transferencia horizontal mediada por bacteriófagos, y se ha realizado la caracterización morfológica y genética de estos fagos Cdt, así como su estabilidad y persistencia bajo diferentes condiciones ambientales y tras diferentes tratamientos de inactivación. Se ha añadido al estudio la persistencia de los fagos portadores de la toxina Shiga bajo las mismas condiciones, por ser el mejor ejemplo de movilidad de factores de patogenicidad en *E. coli* y correspondiendo a la trayectoria del grupo de investigación en estudios de fagos Stx.

Empezando por la distribución de *cdt*, al evaluar la presencia de este gen en una colección de cepas *stx*<sub>2</sub> ambientales, el 12.1% resultaron ser positivas. Estos resultados indican que la incidencia de *cdt* en cepas ambientales es muy similar a la descrita en cepas de origen clínico (Bielazewska *et al.*, 2004; Bielazewska *et al.*, 2009), donde hay una presencia significativa de este gen. Nuestro estudio demuestra que las cepas STEC productoras de Cdt presentan una amplia distribución en el medio ambiente. Dado que las aguas residuales estudiadas contienen un origen fecal bastante definido, mayoritariamente contaminación fecal humana y bovina, esto permite confirmar al menos ambos orígenes como reservorio de las cepas *cdt* positivas y de los fagos Cdt detectados por ensayos de qPCR. Trabajos anteriores describen aislamientos de cepas *cdt* a partir de diferentes orígenes: humanos, ya sean enfermos con problemas intestinales o enfermedades de otro tipo (Dobrindt *et al.*, 2003), animales enfermos y sanos (ganado, perros, pájaros salvajes, etc) (Morabito *et al.*, 2001), alimentos (Cadona *et al.*, 2013), o del medio ambiente (Orth *et al.*, 2006).

De entre todas las variantes, en las cepas estudiadas se observó una mayor prevalencia de la variante *cdt-V* (con casi un 90% de positivos). A pesar de que no hay datos sobre la prevalencia de las variantes en el ámbito clínico en nuestra zona de estudio, sería razonable pensar que pudiera ser coincidente con la prevalencia de la variante Cdt-V en cepas ambientales. Según estudios anteriores, la variante Cdt-V es una de las más prevalentes (Bielazewska *et al.*, 2004; Pickett *et al.*, 2004), y suele estar asociada a cepas STEC fermentadoras de sorbitol de serotipo O157:NM (no móviles) (Janka *et al.*, 2003; Orth *et al.*, 2006). En este trabajo, sin embargo, no se ha podido comprobar esta relación puesto que, aunque la variante Cdt-V fue la más numerosa, la mayoría de las cepas ambientales de la colección no eran O157. En éste y otros estudios, se han encontrado cepas productoras de Cdt pertenecientes a otros serotipos, como O127:HM, O116:H21, y O22:H8, entre otros (Albert *et al.*, 1996; Cadona *et al.*, 2013), y algunos estudios relacionan las variantes de Cdt encontradas en cepas STEC con diferentes regiones geográficas (Orth *et al.*, 2006).

En general, *cdt* suele estar presente en muchos serotipos virulentos de STEC, aunque su presencia no se correlaciona con determinadas variantes de *stx*<sub>2</sub> (Friedrich *et al.*, 2006). Así, aunque *cdt* parece estar asociado a otros factores de virulencia (Cadona *et al.*, 2013), también se puede encontrar en serotipos de *E. coli* que no tienen los principales factores de patogenicidad (*eae*, *saa*, *hly*, etc), por lo que algunos autores sugieren que la toxina Cdt podría contribuir a la patogenicidad de las cepas de *E. coli* que carecen de otros factores de virulencia (Friedrich *et al.*, 2006). En este sentido destacan las descripciones de cepas *eae* negativas donde la prevalencia de *cdt* es muy significativa (Bielawszeska *et al.*, 2004; Orth *et al.*, 2006).

En cuanto a la movilización del gen *cdt* en el medio ambiente, en el presente trabajo se ha confirmado que *cdt-V* puede encontrarse en fagos atemperados inducibles y que éstos pueden transducir el gen de la toxina a otras cepas, tal y como se había sugerido en estudios anteriores, donde se describían secuencias adyacentes a *cdt* homólogas a genes de bacteriófagos (Friedrich *et al.*, 2006; Tóth *et al.*, 2009). Estas cepas además adquieren la capacidad de expresar la toxina y generar el efecto de distensión sobre células en cultivo. Se consiguió inducir y aislar fagos Cdt-V de tres cepas *stx*<sub>2</sub> ambientales, dos en el primer estudio y una en el último estudio, y se obtuvieron lisógenos usando una cepa de *S. sonnei*. El motivo de usar una cepa de *S. sonnei* para transferir los fagos Cdt se explica porque las cepas STEC de las que provienen contienen, además, otros fagos inducibles, al menos un fago Stx. Por tanto, para poder caracterizar los fagos Cdt sin interferencias de otros fagos, la lisogenización

en *S. sonnei*, una cepa que no contiene otros fagos inducibles, aparece como una buena alternativa. Esta cepa ya había mostrado buenas habilidades como cepa huésped de fagos Stx en estudios previos de nuestro grupo (Serra-Moreno *et al.*, 2007).

En este trabajo se ha demostrado experimentalmente la lisogenización simultánea de la cepa huésped *S. sonnei* con un fago Cdt y con un fago Stx, acontecida en uno de los lisógenos. Estudios anteriores del grupo ya demostraron que la doble (e incluso la triple) lisogenia de fagos Stx es un acontecimiento bastante común (Allison *et al.*, 2003; Muniesa *et al.*, 2004; Serra-Moreno *et al.*, 2007; 2008), y en clínica se han descrito muchas cepas STEC que también han resultado ser positivas para *cdt* (Bielaszewska *et al.*, 2004; Bielaszewska *et al.*, 2009; Friedrich *et al.*, 2006), cosa que también se ha confirmado en nuestra colección (Martínez-Castillo *et al.*, 2012). La lisogenia múltiple aparece pues como un mecanismo para incrementar la variabilidad genética entre cepas. Este proceso ocurriría más habitualmente que la lisogenia simple (Serra-Moreno *et al.*, 2008).

El doble lisógeno Cdt-Stx en nuestro estudio se generó sin ningún tipo de selección, apoyando la teoría de que la lisogenia múltiple es común en *E. coli* patogénicas por incorporación de diversos fagos portadores de genes de virulencia, 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, ya que favorece el intercambio genético entre los fagos y la cepa huésped o entre los profagos entre sí (Hendrix *et al.*, 1999).

Tras la caracterización parcial de un fago Cdt-V ( $\Phi$ 125) en el primer estudio, se vio que se trataba de un fago de tipo *Siphoviridae*, similar a un fago Cdt-I descrito anteriormente (Asakura *et al.*, 2007). Sin embargo, la región adyacente al operón *cdt-V* presentó homología con un fragmento del gen *gpA* de fagos de tipo P2. Esta homología con P2 en regiones adyacentes a *cdt-V* ya se había descrito en cepas bacterianas en estudios anteriores (Friedrich *et al.*, 2006; Tóth *et al.*, 2009), a diferencia de las variantes *cdt-I* y *cdt-IV*, que no parecen estar relacionadas con genes de fagos P2, sino con fagos de tipo lamboide (Tóth *et al.*, 2009). También se observó que los lugares de inserción de los fagos Cdt-V en el genoma bacteriano no eran coincidentes con los lugares de inserción descritos para el fago Cdt-I (Asakura *et al.*, 2007).

Estas evidencias sugieren que distintas variantes de Cdt han sido incorporadas en fagos de diferente grupo, probablemente por provenir de cepas bacterianas diferentes

preferentemente infectadas por cada tipo de fagos. Otra posibilidad es que la Cdt original podría haber sido movilizada horizontalmente mediante bacteriófagos y una vez dentro de los fagos haber evolucionado de manera independiente para dar lugar a las diferentes variantes (Tóth *et al.*, 2009). Una tercera opción es que el fragmento conteniendo el gen *cdt* en un fago se haya transferido a otro por recombinación entre los genomas de profagos dentro de un mismo genoma bacteriano, lo que podría haber dado lugar a fagos *Siphoviridae* que contengan secuencias de fagos P2, como lo que se observa en este estudio. En todo caso, la variabilidad entre fagos que llevan genes de virulencia no es un hecho nuevo, y un buen ejemplo son los propios fagos Stx (Schmidt, 2010). En el último estudio presentado en esta tesis, un nuevo tipo morfológico, *Myoviridae*, y un tipo de fago diferente, P2, se describe también como fago Cdt-V, lo que refuerza las observaciones sobre la variabilidad de los fagos que llevan la toxina Cdt.

Las bacterias presentes en un organismo son capaces de responder rápidamente a estímulos ambientales que se produzcan dentro de su hospedador. Además de la interacción con los epitelios superficiales y la competencia con la flora comensal, estas bacterias entran en contacto con sustancias químicas usadas como terapia y con antibióticos usados contra la infección bacteriana. Estudios previos han demostrado que concentraciones subinhibitorias de estos compuestos pueden alterar las propiedades de la bacteria y causar la inducción de los bacteriófagos presentes como profagos, como por ejemplo los fagos Stx (Köhler *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Incluso estas concentraciones subinhibitorias pueden modular la producción de Stx (Grif *et al.*, 1998; Köhler *et al.*, 2000). 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 de estas sustancias podría provocar la inducción de fagos portadores de genes de patogenicidad y su liberación al medio intra y extracelular.

Como tratamos más adelante, la presencia de estos compuestos no parece afectar los niveles de inducción de los fagos Cdt, aunque inicialmente no lo sabíamos, mientras que sí lo hacen con los fagos Stx. La inducción espontánea que presentan los fagos Cdt permitiría la liberación de partículas fágicas al medio ambiente espontáneamente inducidas de sus lisógenos, sin necesidad de que esté presente un agente inductor. Esto concuerda con la presencia de *cdt* en la fracción fágica de muestras ambientales, que indica que estos fagos presentes en el medio ambiente pueden actuar como reservorios de este gen. Una vez en el medio ambiente, los fagos Cdt podrían transducir el gen de la toxina a otras cepas. Por tanto, atendiendo a su papel como potenciales vectores para la transmisión del gen *cdt*, creímos importante estudiar la

estabilidad de los fagos Cdt bajo diferentes condiciones ambientales y su persistencia frente a varios tratamientos de desinfección.

El mismo papel de reservorio y vehículos para la movilización del gen *stx* en el medio ambiente se ha demostrado para los fagos Stx, que han sido detectados y cuantificados en diversos orígenes y ambientes (Muniesa and Jofre, 1998; Dumke *et al.*, 2006; Imamovic *et al.*, 2010; Martínez-Castillo *et al.*, 2013). También se ha sugerido una mayor persistencia de los fagos Stx aislados del medio ambiente respecto a las cepas STEC huésped bajo diferentes condiciones (Muniesa *et al.*, 1999a), así como la persistencia de fagos Stx bajo tratamientos aplicados a alimentos (Rode *et al.*, 2011).

Sin embargo, el verdadero problema de los fagos portadores de genes de virulencia en el medio ambiente sería el hecho de que aquellos que no se inactivan podrían ser capaces de transducir el gen de virulencia a nuevas cepas huésped. Esto supone un peligro potencial ya que puede ocasionar, mediante un proceso de transferencia horizontal, la aparición de nuevas cepas patógenas. Un ejemplo muy reciente lo encontramos en el brote ocurrido en Mayo del 2011 en Alemania y Francia, causado por una STEC O104:H4 (Buchholz *et al.*, 2011; King *et al.*, 2012). La hipótesis más aceptada es que esta cepa se originó por adquisición de un fago Stx liberado al medio ambiente por otra cepa STEC (Muniesa *et al.*, 2012), que lisogenizó una *E. coli* O104:H4 enteroagregativa inicialmente negativa para *stx*, generando así una nueva cepa muy virulenta, por la suma de su capacidad enteroagregativa y la producción de la Stx (Bielaszewska *et al.*, 2011). Por la importancia de este hecho, se ha querido evaluar también la persistencia de fagos Stx bajo las mismas condiciones de estabilidad y los mismos tratamientos de inactivación usados en el estudio de los fagos Cdt, y así poder compararlos.

Hay que remarcar que en estos estudios sólo se han evaluado dos fagos de cada tipo, Stx o Cdt, aunque se sabe que los fagos Stx son un grupo muy heterogéneo (Herold *et al.*, 2004; Muniesa *et al.*, 2004) y, por lo visto en este estudio, también los fagos Cdt parecen ser un grupo muy heterogéneo. Por eso, los resultados no tienen por qué extrapolarse a todos los fagos de cada tipo, aunque en el caso de los fagos Stx evaluados, éstos pertenecen al grupo *Podoviridae*, que es el más común dentro de los Stx. Por el contrario, dado que existen pocas descripciones de fagos Cdt, no se puede afirmar que los fagos usados en este estudio sean los más representativos del grupo.

Al analizar la estabilidad de los fagos, se observa en ambos casos una gran estabilidad a diferentes temperaturas y pHs, excepto a pH 3. No hay datos previos sobre

fagos Cdt, aunque su abundancia medioambiental sugiere que estos fagos presentan cierta estabilidad. Por el contrario, estudios anteriores indicaban que algunos fagos Stx, en concreto el fago 933W, perdían su capacidad de infección después de pocas horas tras la inducción y almacenamiento a 4°C (O'Brien *et al.*, 1984). Esto resultaba contradictorio con la abundancia de fagos Stx en diversos ambientes extraintestinales descritos por nuestro grupo y por otros autores. Los resultados del presente estudio demuestran que la baja estabilidad de los fagos Stx no es general y que algunos fagos Stx sí que son capaces de permanecer infectivos tras un mes a 4°C, incluso a 22°C y 37°C. Se confirma que los fagos Stx también pueden persistir tras ciertos tratamientos de inactivación y en experimentos de inactivación natural, resultados mucho más acordes con su abundancia en el medio ambiente. A pesar de que también hay poca información sobre persistencia de fagos Stx, en general nuestros datos coinciden con otros autores y, algunas diferencias de estabilidad observadas en los fagos Stx de nuestro estudio comparándolo con otros (Rode *et al.*, 2011), pueden explicarse por la variabilidad y heterogeneidad de estos fagos, y por las condiciones experimentales utilizadas.

En los estudios de estabilidad llevados a cabo en este trabajo, se compararon los valores de fagos infecciosos (estudios de infectividad) y los valores de genomas de fago (estudios de qPCR). Hay que destacar que los valores de genomas no necesariamente se correlacionan con el número de partículas infecciosas, que son las potencialmente peligrosas para la transmisión del gen de la toxina. En nuestro estudio, bajo los diferentes tratamientos, la reducción de genomas fágicos fue mucho menor (y prácticamente inexistente) que la presentada por las partículas infecciosas. De esta manera, vemos que el número de partículas fágicas infecciosas merma más rápidamente, mientras que el ADN permanece intacto (al menos el fragmento que se amplifica en el ensayo de qPCR utilizado). En este estudio queremos resaltar la importancia de correlacionar correctamente los valores de infectividad, que representan un riesgo real, con los valores de genomas obtenidos por técnicas moleculares cuando se estudian virus, tal como ya se demostró en otros estudios realizados con fagos Stx (Imamovic *et al.*, 2010).

Hay que destacar que los métodos cultivables pueden subestimar los valores reales de virus ya que dependen del uso de un huésped susceptible adecuado. En cambio, los métodos independientes de cultivo, como la qPCR, no se limitan a un huésped en concreto, pero generan datos de partículas virales totales, infecciosas y no infecciosas, siendo las no infecciosas las que ya no representan ningún riesgo de transducción del gen de la toxina. De todos modos, los métodos moleculares permiten niveles de sensibilidad y rapidez en la obtención de resultados que no los hace en absoluto descartables, siempre que se tenga en



cuenta la premisa anteriormente citada, esto es, que los valores obtenidos no se correlacionan necesariamente con la infectividad de la partícula vírica, y en el caso de los fagos Cdt o los fagos Stx, con su capacidad de transducir el gen de la toxina.

Si comparamos los resultados de estabilidad de los fagos Cdt y los Stx, tanto los unos como los otros mostraron una gran estabilidad a diferentes temperaturas y pHs a lo largo de un mes, excepto en el caso de pH ácido, donde se inactivaron en un día o dos, a diferencia de otros fagos que resisten en ambientes más ácidos (Jończyk *et al.*, 2011). Es remarcable que el pH ácido también inhibe la inducción de fagos Stx a partir de sus lisógenos (Imamovic y Muniesa, 2011), y se considera que puede ser un mecanismo de las bacterias para resistir el paso por los ambientes ácidos del estómago, sin inducir fagos y sin ser lisadas antes de llegar al intestino. En vista de los resultados actuales, el bajo pH también inhibe la infectividad de los fagos libres que puedan estar presentes en estos ambientes, lo que determina que no se pueda transducir el gen de la toxina en estas condiciones (Imamovic y Muniesa, 2012).

En cuanto a los tratamientos de inactivación utilizados (cloración, tratamiento térmico, luz UV e inactivación natural), en todos los casos se comprobó que las bacterias se inactivan con mayor rapidez que los fagos, tal y como ya se ha descrito en estudios anteriores (Durán *et al.*, 2002; Mocé-Llivina *et al.*, 2003), sugiriendo así que los fagos pueden actuar mejor como reservorio ambiental de los genes *cdt* y *stx* al ser mucho más resistentes ante condiciones de inactivación.

Consecuentemente, los valores de inactivación de los fagos Cdt y Stx en ambos estudios son similares a los fagos virulentos que se incluyen como referencia. Así, los valores de inactivación de los fagos Cdt ante los tratamientos aplicados en este estudio fueron muy similares a los del fago control SOM23, que también presenta una morfología *Siphoviridae*, descrita como una de las más resistentes junto a los *Myoviridae* (Durán, *et al.*, 2002; Lee y Sobsey, 2011; Muniesa *et al.*, 1999b), y los resultados concuerdan con estudios anteriores hechos con otros fagos de *E. coli* (Cunault *et al.*, 2011; Dee y Fogleman, 1992) y con los resultados de esta tesis obtenidos con el fago SC12. Así, existen estudios que relacionan determinadas morfologías fágicas con una mayor resistencia en el medio ambiente (Lasobras *et al.*, 1997; Muniesa *et al.*, 1999b). En general, parece que los fagos con cápside grande y cola suelen ser más estables bajo condiciones adversas como fluctuaciones de temperatura, de pHs o desecación (Jończyk *et al.*, 2011). Aun así, hay descripciones de fagos de la misma familia con persistencias diferentes, o fagos que viven en un mismo ambiente con similar persistencia pero que difieren en morfología y estructura (Bettstetter *et al.*, 2003).

Los tratamientos de cloración usados en estos estudios corresponden a las concentraciones comúnmente usadas para el tratamiento del agua de bebida, que eliminan completamente las bacterias en poco tiempo, para conseguir que el agua sea apta para el consumo humano. Del mismo modo, el tratamiento UV y el tratamiento térmico se usan comúnmente en la descontaminación y tratamiento de aguas y alimentos. Aunque la cloración ha mostrado su efectividad inactivando rápidamente los fagos Cdt y Stx tras los primeros minutos, la presencia de fagos infecciosos que aún pueden ser detectados tras 20 minutos de tratamiento supone un problema por su potencial para transducir el gen y causar la emergencia de cepas patógenas. Del mismo modo, se detectaron fagos infecciosos tras el tratamiento con luz ultravioleta (con posibilidad de transducir el gen de la toxina Stx) y el tratamiento térmico, aunque en este último caso no se consiguió detectar transductantes. Dado que los fagos infecciosos persistían razonablemente bien al tratamiento térmico, no se sabe por qué no se obtienen lisógenos tras este tratamiento. Posiblemente las partículas fágicas tras el tratamiento aún eran capaces de causar lisis, pero el tratamiento de algún modo limitó su capacidad de lisogenia y por tanto redujo la frecuencia de generación de lisógenos.

En cuanto a los estudios de inactivación natural, permitieron la evaluación de diferentes factores ambientales de manera simultánea. Probablemente, la inactivación de los fagos Cdt y Stx que se observó en este estudio fue debida en gran parte a la radiación solar (Davies-Colley *et al.*, 1999) y puede que parcialmente a las variaciones de temperatura en verano e invierno, puesto que el resto de variables (pH o concentración de sales, turbidez) se mantuvieron bastante estables a lo largo del experimento y dado que la temperatura parecía no afectar demasiado a la estabilidad de los fagos. Se puede concluir, por tanto, que la inactivación natural de los fagos es multifactorial y depende de la combinación de muchos factores, y que la variación de uno de ellos podría suponer un cambio en la sensibilidad de los fagos a otro de los factores (Müller-Merbach *et al.*, 2004). El único factor que no se evaluó en estos experimentos fue la presencia de protozoos, por el uso de membranas de diálisis, aunque en principio la actividad depredadora de los protozoos parece restringida a microorganismos de mayor tamaño que los virus (Gonzalez *et al.*, 1990) y por tanto no se esperaría que tuviera un gran efecto inactivador.

La mayor persistencia del fago SC12 respecto a los fagos Stx en condiciones de inactivación natural contrasta con la menor estabilidad demostrada en condiciones de laboratorio. Dado que este fago se aisló de agua de río, es posible que esté mejor adaptado a persistir bajo condiciones naturales que los fagos Stx.

Es necesario comentar que los estudios de transducción de *stx* se llevaron a cabo en el laboratorio, bajo las condiciones experimentales más óptimas, de manera que todavía queda averiguar el verdadero riesgo que supone la transducción de *stx* o de otros genes de virulencia en condiciones ambientales reales. Sin embargo, dadas las evidencias de que tanto los fagos Cdt como los fagos Stx circulan libremente en el ambiente y de su elevada persistencia, si algunos fagos sobreviven y siguen siendo infecciosos tras el tratamiento, existe el riesgo potencial de que sean capaces de provocar la aparición de nuevas cepas patógenas que podrían suponer un riesgo para la salud humana (Muniesa *et al.*, 2012).

Por eso, sería deseable considerar este riesgo potencial al elaborar normativas dirigidas a garantizar la calidad de los alimentos y de las aguas de consumo. Estas normativas contemplan la eliminación de patógenos bacterianos, pero en vista de estos resultados, también parece importante tener en cuenta el control de bacteriófagos. La aplicación combinada de diferentes tratamientos de inactivación o la aplicación de los ya existentes durante un tiempo suficiente para que se garantice la inactivación de fagos infecciosos minimizaría el riesgo potencial asociado a los fagos, tal y como ya se ha propuesto en el caso de patógenos bacterianos (McKenzie *et al.*, 2014). Aunque hay que reconocer que la gran heterogeneidad de los fagos y las persistencias tan variables que presentan podrían suponer un problema y todavía no es concluyente el riesgo real que los fagos pueden representar. Por tanto, serían necesarios más estudios en este ámbito que permitieran tomar decisiones al elaborar las normativas.

Analizando las propiedades de los fagos Cdt para transferir el gen de la toxina, se observó que los fagos Cdt-V presentan inducción espontánea. Esto contrasta con estudios anteriores realizados con el fago Cdt-I, que requiere mitomicina C para activar su ciclo lítico (Asakura *et al.*, 2007). Como se ha comentado anteriormente, esta capacidad de auto-inducción implica que posiblemente estos fagos presentan una mayor difusión y distribución en el medio ambiente y concuerda con los resultados de prevalencia de los fagos Cdt en el medio ambiente. Sin embargo, desconocíamos el motivo de esta inducción espontánea antes de realizar los experimentos del último estudio.

Tras la secuenciación completa del genoma fágico de un fago Cdt-V ( $\Phi$ AA91-ss), inducido a partir de un lisógeno en *S. sonnei*, vimos que se trataba de un fago de tipo P2, con una organización genética prácticamente idéntica. Los fagos P2 son un grupo diverso y ampliamente extendido en *E. coli* y otros grupos bacterianos (Bullas *et al.*, 1991; Nakayama *et al.*, 1999). El fago secuenciado ( $\Phi$ AA91-ss) presentó una morfología *Myoviridae*, correspondiente también con los fagos P2, aunque también se han descrito

otros fagos Cdt de morfología *Siphoviridae* (Asakura *et al.*, 2007 y estudios presentados en esta tesis). La homología con fagos P2 de las regiones adyacentes a los genes *cdt* en fagos Cdt-V ha sido descrita antes (Sváb *et al.*, 2013), aunque no siempre hay secuencias relacionadas con los P2 alrededor de los genes *cdt* (Tóth *et al.*, 2009).

El hecho de que  $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss sean fagos de tipo P2 explica que los agentes inductores no tengan efecto sobre la activación del ciclo lítico, puesto que ya ha sido descrito que la proteína C (que promueve el ciclo lisogénico del fago P2) no puede ser cortada por la proteína RecA en su secuencia alanina-glicina. Esto hace que se mantengan siempre los mismos niveles de inducción fágica, y por eso en P2 la presencia de inductores no tiene ningún efecto (Lundqvist *et al.*, 1984; Bertani *et al.*, 1988).

En el caso del fago Cdt-I, que sí requiere mitomicina C para activar su ciclo lítico (Asakura *et al.*, 2007), se trata de un fago de tipo lamboide. La diferente organización genética de ambos fagos explicaría las diferencias en cuanto a los mecanismos de inducción, ya que en estos fagos el represor CI (que promueve el ciclo lisogénico) sí que puede ser cortado por la proteína RecA, activada en presencia de agentes inductores, lo que lleva a inhibición del ciclo lisogénico y activación del ciclo lítico, aumentando el número de fagos al ser sometidos a un agente inductor.

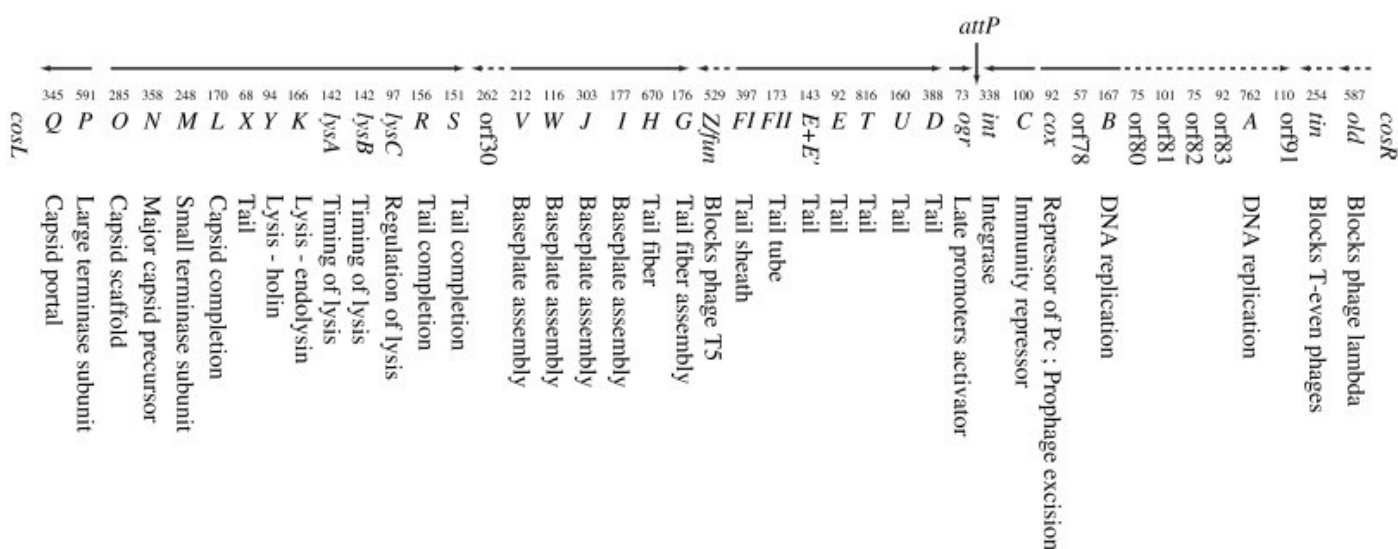


Figura 19. Organización genética de los fagos de tipo P2 (Nilsson y Haggård-Ljungquist, 2007).

Los fagos de tipo P2 tienen un sistema de regulación complejo de los ciclos lítico y lisogénico en el que participan varias proteínas reguladoras, diferente del de los fagos de tipo lamboide. En los fagos P2 encontramos dos promotores principales:  $P_e$ , que activa la

expresión de los genes de lisis, y  $P_c$ , que activa la de los genes de lisogenia. En función del balance entre las proteínas reguladoras C (represor de lisis, activa el ciclo lisogénico) y Cox (represor del ciclo lisogénico, activa la lisis). En determinadas condiciones se activará uno u otro promotor y el fago se decantará por la lisis o por la lisogenia (Saha *et al.*, 1987). Así, si los niveles de Cox son elevados, se inhibirá el promotor  $P_c$ , y no habrá síntesis de C, de manera que se producirá la expresión de los genes de lisis. Al contrario, si hay una elevada expresión de C, se inhibirá la expresión de genes a partir de  $P_e$ , y se favorecerá la lisogenia. Además, también se produce una autorregulación de los genes C y *cox*. Todos estas interacciones determinarán el balance y la decisión entre una u otra vía.

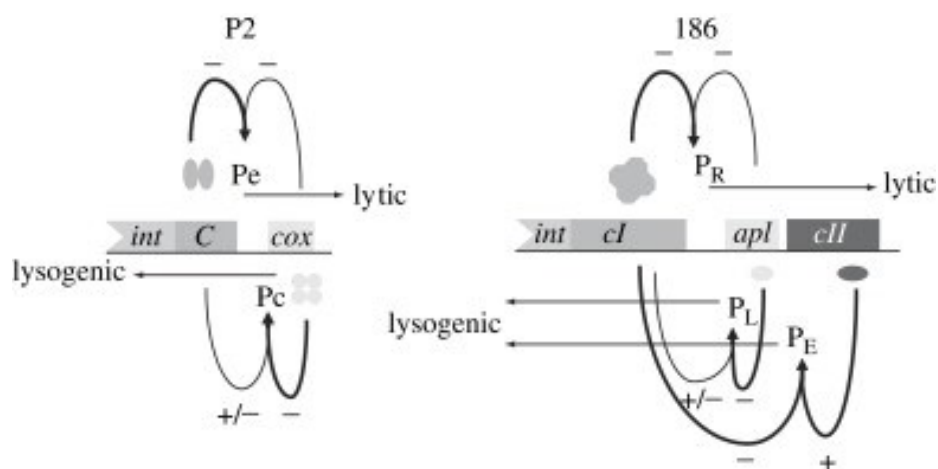


Figura 20. A la izquierda, regulación de los promotores  $P_e$  y  $P_c$  por las proteínas C y Cox en los fagos P2 (Nilsson y Haggård-Ljungquist, 2007).

El estudio de la secuencia del fago  $\Phi$ AA91-ss dio respuesta a otros interrogantes planteados al caracterizar los fagos Cdt. Al comparar las capacidades de generar calvas de lisis de los fagos Cdt-V a partir de la cepa original ( $\Phi$ AA91) y del fago Cdt-V obtenido de un lisógeno en *S. sonnei* ( $\Phi$ AA91-ss), vimos que no se observaban diferencias, sin embargo, el fago  $\Phi$ AA91-ss mostraba una tasa de generación de lisógenos muy superior a la del fago original. Al comparar las secuencias de ambos fagos, la principal diferencia era una secuencia IS21 insertada en  $\Phi$ AA91-ss, acontecimiento que, tal como se demostró, se produjo tras la lisogenización en la cepa de *Shigella*.

Las secuencias de inserción son muy comunes en *E. coli* y *Shigella*, y provocan diferentes cambios en el genoma, como deleciones, inserciones o intercambios genéticos (Yang *et al.*, 2005). Son elementos de transposición, con capacidad de movilizar ADN sin

necesidad de homología entre las secuencias. IS21 fue descubierto en experimentos de movilización cromosómica en *Pseudomonas aeruginosa* y está formado por unos extremos muy conservados de secuencias de repetición invertidas, seguidas de MTRs (“*Multiple Terminal Repeats*”) menos conservadas y de una zona central compuesta por dos genes: *istA*, que codifica la transposasa y la cointegradora, y *istB*, que codifica una proteína que ayuda a la eficiencia del proceso de translocación (Berger y Haas, 2001).

En el caso del fago  $\Phi$ AA91-ss, IS21 se encuentra insertado en medio del gen *cox*, que codifica la proteína Cox, responsable de la inhibición de la integrasa fágica (codificada en *int*) y de la activación de la excisión (Saha *et al.*, 1987). De este modo, una mutación en el gen desinhibe la integrasa, lo que facilitaría la integración fágica, pudiendo aumentar la capacidad de generar lisógenos aproximadamente 13 veces, tal y como se ha demostrado en este trabajo (publicación 4). Curiosamente, el hecho que una mutación inactivante de *cox* pudiera causar un incremento entre 5-20 veces en la capacidad de lisogenizar cepas ya se había descrito a nivel teórico (Lindahl *et al.*, 1972; Bertani *et al.*, 1988), y coincide con lo que se observó al generar lisógenos con  $\Phi$ AA91-ss. Este hecho es una evidencia clara de la evolución de los fagos tras infectar a nuevas cepas huésped. Algunas de estas modificaciones les permiten adaptarse mejor a la cepa y seleccionar variantes fágicas con mejores ventajas evolutivas, como en este caso la mayor capacidad de generación de lisógenos. Esto podría suponer una mayor supervivencia del genoma fágico y favorecería la transmisión vertical de sus genes.

Los bacteriófagos se consideran “depredadores” y enemigos naturales de las bacterias. Sin embargo, algunos fagos han evolucionado para establecer relaciones con sus bacterias huésped que podrían calificarse de simbióticas. Es evidente que los fagos y las bacterias han evolucionado en paralelo para poblar todos los ambientes, desarrollando en muchos casos una especificidad tremendamente elevada por la especie, e incluso la cepa bacteriana que infectan (especificidad de huésped). Una evidencia de este hecho es que, en muchos casos, el contenido G+C del fago es muy parecido al del huésped, indicando su adaptación a éste (Esposito *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1999). Además, se ha observado una elevada similitud de secuencia y una organización parecida de los genes estructurales entre los fagos y sus huéspedes (Nilsson y Haggård-Ljungquist, 2007).

En el caso de fagos atemperados existe además una competición entre fagos por un mismo huésped, cosa que resulta en el incremento del fitness del fago por incremento del fitness del huésped o en la reducción del fitness de los fagos competidores, ya sea por el bloqueo de la integración o la represión de su transcripción. Esta competición

parece haber generado estrategias de supervivencia de los fagos para poderse integrar al huésped, tales como el desarrollo de diferentes inmunidades o de diferentes lugares de integración (Nilsson y Haggård-Ljungquist, 2007). Además, la evolución de los fagos también va ligada a su capacidad de adaptación al huésped, garantizando que será admitido por éste gracias al hecho de contener genes que le aporten ventajas, normalmente favoreciendo una mejor adaptación del huésped al medio.

Por ejemplo, se sabe que la presencia de fagos Stx va directamente ligada con la persistencia de cepas STEC en ecosistemas acuáticos (Mauro *et al.*, 2013). Algunos estudios indican que el hecho de contener la toxina Stx podría incrementar la supervivencia de estas cepas bajo condiciones desfavorables, como la predación debida a los protozoos, ya que la toxina Stx es letal para los protozoos y por tanto las cepas que producen la toxina no son fagocitadas o en caso de serlo sobreviven (Steinberg y Levin, 2007; Stolfa y Koudelka, 2012; Mauro *et al.*, 2013). Las diferentes cepas STEC también presentan persistencias diferentes, probablemente debido al serotipo de la cepa, los niveles de inducción del fago Stx y de la toxina, el tipo de Stx expresada o la expresión de otros genes (Mauro *et al.*, 2013). La adquisición y expresión de *stx*, así como de otros genes de virulencia, comportaría una ventaja adaptativa y evolutiva que incrementaría la supervivencia de la cepa ante condiciones más desfavorables.

Del mismo modo, la presencia de Stx puede explicarse como una ventaja para las cepas de STEC en su reservorio natural, el tracto digestivo del ganado bovino. El tracto intestinal de los rumiantes contiene un elevado número de protozoos y la presencia de la Stx confiere una ventaja a las STEC frente a otras bacterias para sobrevivir en este microambiente sin ser fagocitadas, gracias a la actividad tóxica de la Stx sobre algunos protozoos (Steinberg y Levin, 2007; Stolfa y Koudelka, 2012). Sin embargo, las cepas han de pagar un precio por la incorporación del fago y su toxina. La presencia de un fago atemperado con capacidad de activar el ciclo lítico se puede entender como una potencial bomba de relojería que puede causar la lisis y la muerte celular ante determinadas condiciones que induzcan al fago.

En el caso de los fagos Cdt, se desconoce cuál puede ser la ventaja que le confiere la incorporación de estos fagos a la bacteria. Probablemente la toxina tiene funciones desconocidas pero necesarias para la supervivencia del huésped en su nicho original. Es obvia la actividad tóxica de la Cdt cuando se expresa en un organismo humano o en células en cultivo. Por ejemplo, se ha demostrado el papel que juega esta toxina en la capacidad de invasión de *Campylobacter spp.*, o en la formación de las lesiones en la colonización del intestino. También se ha demostrado que en modelos “*in*

*vitro*” de angiogénesis inhibe la proliferación de células endoteliales (Svensson *et al.*, 2002), y que interfiere con la respuesta inmune. Así, la Cdt parece ser una toxina bacteriana muy versátil, que es utilizada por una gran variedad de patógenos.

Sin embargo, como muchos otros patógenos, las STEC (incluyendo las que producen Cdt) parece que son patógenos de humanos casi por casualidad, y que los humanos son huéspedes accidentales y no su reservorio natural. Así, la ventaja de adquirir la Cdt en el reservorio natural de STEC (probablemente los rumiantes, como se comenta arriba) se desconoce. La amplia distribución de la toxina en diferentes géneros bacterianos y su capacidad de modificar el ciclo de las células eucariotas, sugieren que tienen como diana organismos eucariotas cercanos a los nichos de las distintas bacterias que la producen, y que posiblemente la Cdt ha evolucionado para adaptarse a dichos organismos eucariotas (generando las variantes de la toxina) (Gargi *et al.*, 2012). Por su parte, los fagos Cdt que infectan a las distintas bacterias han evolucionado para movilizar el gen y aumentar su dispersión, que se ha producido porque es ventajosa para las bacterias. Así, aunque la función última de la Cdt es inhibir la proliferación celular, puede conferir diferentes características de virulencia a diversas especies bacterianas, que permitirían una mayor supervivencia de éstas (Heywood *et al.*, 2005).

En el genoma fágico, el ADN intercambiado por transferencia horizontal se suele encontrar en ciertas regiones, denominadas “*hot spots*” o “regiones calientes”, que tienen una elevada variabilidad y son ricas en A-T (Nilsson *et al.*, 2004). Así, vemos que en el fago Cdt-V secuenciado ( $\Phi$ AA91-ss) los genes *cdt* están insertados en una región del genoma llamada TO, tal y como ya se ha descrito anteriormente en otros fagos Cdt (Odegrip *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2007). Es una región de elevada recombinación, y es muy variable dentro de los profagos de tipo P2 en *E. coli*, puesto que puede contener ADN de diversos orígenes.

En los fagos P2, además de la TO, se han descrito otras dos regiones de integración de genes por transferencia horizontal: la región Z, que contiene los genes de función desconocida Z y *fun*, y otra región que contiene el orf30, también de función desconocida (Nilsson y Haggård-Ljungquist, 2007). Así, son zonas “*hot spot*” de elevada variabilidad dentro del genoma fágico que han sido adquiridas por recombinación específica de sitio. También suelen ser regiones ricas en A-T, y estar rodeadas por secuencias IR (o repeticiones invertidas) muy conservadas, que son muy similares a secuencias adyacentes a regiones genéticamente inestables localizadas entre genes desconocidos o asociados a virulencia en muchos huéspedes bacterianos del grupo de las enterobacterias (Nilsson *et al.*, 2004). El hecho de encontrar genes y regiones muy



similares en diferentes grupos de bacterias es otra evidencia de que su transmisión es horizontal, y de que los fagos juegan un papel importante en este proceso.

Los fagos son un grupo muy heterogéneo, con diferentes morfologías, tipos de replicación o ácidos nucleicos. Su clasificación es complicada, puesto que muchas veces fagos de morfología similar no están relacionados a nivel nucleotídico. A pesar de ello, se pueden establecer grupos de fagos con una organización genética común (como los de tipo P2 o los lamboides). Podemos encontrar fagos con secuencias totalmente diferentes y la misma arquitectura genómica o genes comunes, sugiriendo que provienen de un mismo ancestro común (Hatfull y Sarkis, 1993). Y también existen fagos totalmente diferentes en cuanto a morfología, espectro de huéspedes y estructura, pero que presentan similitudes en la secuencia (Ford *et al.*, 1998).

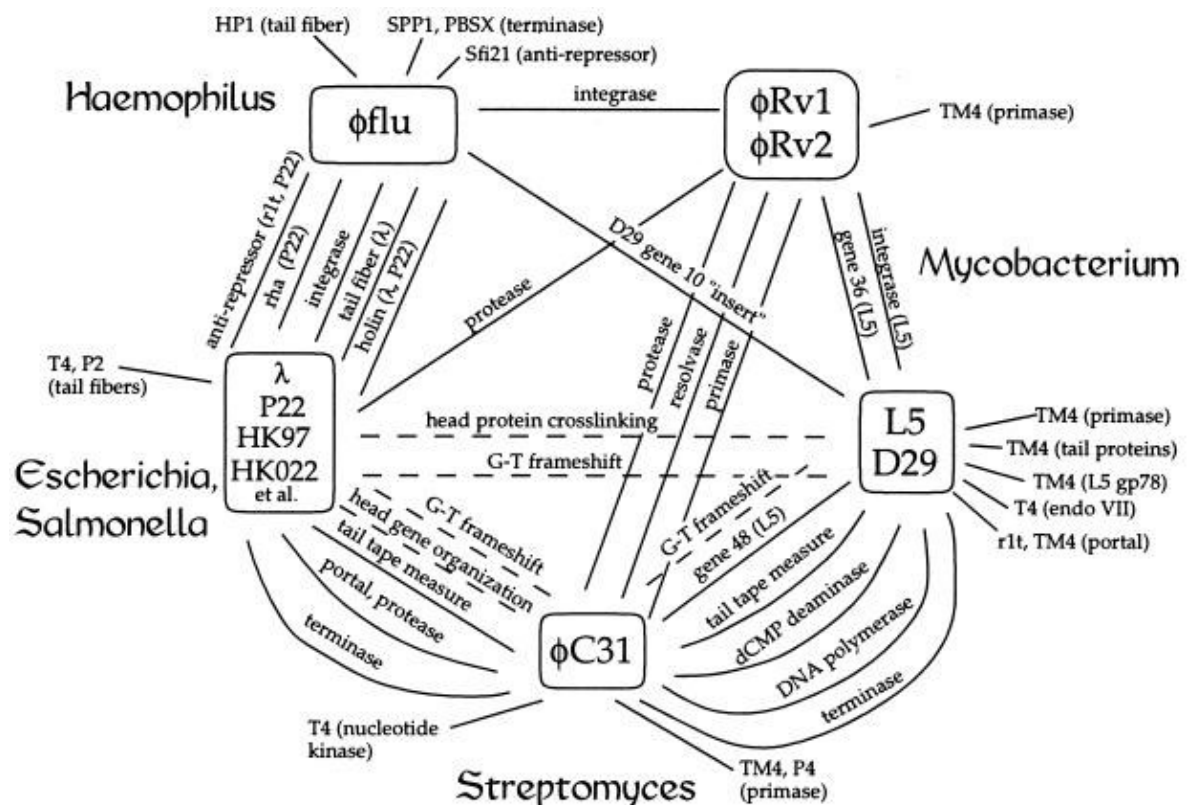


Figura 21. Similitudes de secuencia (líneas continuas) y de organización genética (líneas discontinuas) de varios fagos y profagos que infectan a diferentes huéspedes (Hendrix *et al.*, 1999).

Esta enorme variabilidad en los fagos, tal y como ya se ha descrito a lo largo de este trabajo, evidencia la evolución constante de estos organismos. Pero, ¿cuándo se ha

producido esta evolución? Hay dos modelos que pueden explicar el mosaicismo genético de los fagos: una primera teoría que indica que la mayoría del intercambio de genes por transmisión horizontal se produjo en una fase inicial de la historia de los fagos y que se ha mantenido por transmisión vertical hasta ahora. La otra teoría indica que la transmisión horizontal se ha producido de manera continua desde los inicios hasta la actualidad (Hendrix et al., 1999). Este último modelo implica que los genomas fágicos han ido evolucionando desde los inicios, pasando por diferentes estadios intermedios, adaptándose continuamente al huésped y al medio, pudiendo haber evolucionado incluso tanto como para pertenecer a grupos totalmente diferentes. Así, parece más lógico pensar que la evolución fágica se produce de manera continua y constante a fin de adaptarse a nuevas condiciones y huéspedes.

Nuestros estudios confirman la segunda teoría de forma experimental, con cambios adaptativos observados tan sólo tras un cambio de huésped. Esta observación, junto con las numerosas evidencias de genomas fágicos conteniendo secuencias de otros fagos, generando el mosaicismo típico de los fagos, sugieren que, aunque ambas teorías no son totalmente excluyentes, la segunda parece tener mayor relevancia en su evolución.

Resumiendo, los fagos se encuentran en continua evolución en su necesidad de adaptarse al huésped y al medio ambiente, intercambiando genes mediante transferencia horizontal y dirigiendo, junto a otros elementos genéticos móviles (como plásmidos, islas de patogenicidad o transposones), la evolución del genoma bacteriano, donde tiene especial importancia la transferencia y expresión de genes de virulencia. Este estudio es un ejemplo no sólo de la capacidad de los fagos de adquirir, intercambiar o transducir genes entre diferentes especies o géneros bacterianos, sino de la evolución de éstos al pasar de una cepa huésped a otra, como la selección de tipos de fago capaces de generar un mayor número de lisógenos presentado en este estudio, y que supone una ventaja evolutiva tanto para el fago como para el huésped.

## **5. CONCLUSIONES**



- Cepas positivas para el gen *cdt* han sido aisladas a partir de muestras ambientales con contaminación de origen humano y bovino. De las cinco variantes conocidas, la Cdt-V ha resultado ser la más prevalente en estas cepas.
- La presencia de *cdt* en cepas STEC indica cierta relación entre las dos toxinas, así como también parece existir relación entre Cdt y otros factores de virulencia, puesto que se han encontrado cepas positivas para varios de estos factores. De esta manera, Cdt estaría contribuyendo a la patogenicidad de estas cepas, aunque aún se desconoce el mecanismo exacto de acción o el papel de esta toxina “*in vivo*”.
- Se ha demostrado que el gen *cdt* se transmite de unas cepas a otras en un proceso de transferencia horizontal mediada por bacteriófagos, tal y como sugieren secuencias adyacentes al gen de la toxina, homólogas a secuencias de genes codificados en fagos.
- Se han aislado fagos Cdt de diferentes muestras ambientales con contaminación fecal humana y animal. Por tanto, existe cierta prevalencia ambiental de fagos Cdt, que podrían estar actuando como reservorios de *cdt* y ser capaces de transducir el gen de la toxina a otras cepas, dando lugar a nuevas cepas patógenas.
- Se confirma la capacidad de los fagos Cdt de generar lisógenos junto a los fagos Stx. Esta lisogenia múltiple se interpreta como un posible mecanismo para incrementar la variabilidad genética de las cepas bacterianas.
- Los fagos Cdt y los fagos Stx infecciosos son estables a diferentes temperaturas y pHs durante un mes, así como también son capaces de sobrevivir tras diferentes tratamientos de inactivación (cloración, tratamiento térmico, luz UV o inactivación natural).
- Los fagos Cdt y los fagos Stx pierden su infectividad rápidamente a pH 3.
- La estabilidad de los fagos Stx tras un mes a diferentes temperaturas y pHs contradice observaciones anteriores del fago 933W, que mostraba rápida inactivación a 4°C, y concuerda con la abundancia de fagos Stx en el medio ambiente.
- La inactivación natural de fagos Stx y fagos Cdt en un mesocosmos es mayor en los meses de verano que en los meses de invierno, y sugiere que el sol y/o la temperatura son los factores inactivadores más importantes. Sin embargo la acción multifactorial del sistema de mesocosmos utilizado no permite confirmar cuál es el factor más influyente.

- Los fagos Cdt y los fagos Stx son más resistentes y persisten durante más tiempo que sus bacterias huésped, lo que reafirma el papel de estos fagos como reservorios de genes de toxinas en el medio ambiente, y el consiguiente potencial en la transmisión de estos genes a nuevas cepas.
- La inactivación de los fagos Cdt y Stx evaluada mediante la cuantificación de sus genomas indica muy baja inactivación en todas las condiciones comparado con la determinación de fagos infecciosos. Esto sugiere que, aunque los métodos moleculares permiten una determinación precisa del número de virus, se ha de tener en cuenta que detectan partículas víricas totales, incluyendo las no infecciosas, que no representan ningún riesgo potencial en la generación de patógenos.
- En este estudio se han descrito fagos Cdt-V de tipo P2. El genoma de los fagos Cdt-V  $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss es muy similar a la de otros fagos P2, y difiere de otros fagos Cdt-I descritos. Dado que anteriores descripciones indican que los fagos Cdt-I son de tipo lamboide, se confirma una gran heterogeneidad dentro de este grupo, tanto en morfología como en estructura genética.
- Todos los fagos Cdt-V de este estudio presentan inducción espontánea, dado que no necesitan agente inductor para producir un elevado número de fagos. El hecho de que ciertos fagos Cdt (en este estudio:  $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss) sean de tipo P2, explica la inducción espontánea observada.
- En los fagos Cdt  $\Phi$ AA91 y  $\Phi$ AA91-ss, el gen *cdt* se encuentra en una región del genoma llamada TO, una zona de recombinación específica de elevada variabilidad donde se produce la transferencia horizontal de genes. También se han descrito otras regiones similares en los fagos P2, con secuencias adyacentes muy conservadas y similares en distintos grupos de enterobacterias.
- La inserción de una secuencia IS21 en medio del gen *cox* del fago  $\Phi$ AA91-ss, incorporada tras la lisogenización de una cepa de *S. sonnei*, ha comportado cambios en el fago, incrementando su capacidad de formación de lisógenos. Se trata de un ejemplo de evolución fágica en el que la inserción le permitirá ser más eficaz en su adaptación al huésped y al medio ambiente. Así pues, los fagos y sus huéspedes se encuentran en continua evolución, adquiriendo o perdiendo genes que les supongan una ventaja evolutiva y les permitan una mayor adaptación.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**





1. **Acheson D.W.K., Reidl J., Zhang X., Keusch G.T., Mekalanos J.J., and Waldor M.K.** 1998. In vivo transduction with Shiga toxin 1-encoding phage. *Infect. Immun.* **66**:4496-4498.
2. **Ackermann H.W.** 2009. Chapter 13: Phage classification and characterization. Clokie M.R.J., Kropinski A.M. (eds). *Bacteriophages: Methods and Protocols. Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, vol. 501. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media. DOI 10.1007/978-1-60327-164-6.
3. **Adams M.H.** 1949. The stability of bacterial viruses in solutions of salts. *J. Gen. Physiol.* **32**:579–594.
4. **Allison H.E.** 2007. Stx-phages: drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiol.* **2**:165-174.
5. **Allison H.E., Sergeant M.J., James C.E., Saunders J.R., Smith D.L., Sharp R.J., Marks T.S., and McCarthy A. J.** 2003. Immunity profiles of wild-type and recombinant Shiga-like toxin-encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens. *Infect. Immun.* **71**:3409–3418.
6. **Allué-Guardia A., García-Aljaro C., and Muniesa M.** 2011. Bacteriophage-encoding *cytolethal distending toxin type V* gene induced from nonclinical *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.* **79**:3262-3272.
7. **Allué-Guardia A., Jofre J., and Muniesa M.** 2012. Stability and infectivity of cytolethal distending toxin type V gene-carrying bacteriophages in a water mesocosm and under different inactivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:5818-5823.
8. **Anderson J.D., MacNab A.J., Gransden W.R., Damm S.M., Johnson W.M., and Lior H.** 1987. Gastroenteritis and encephalopathy associated with a strain of *Escherichia coli* O55:K59:H4 that produced a cytolethal distending toxin. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **6**:1135-1136.
9. **Asakura M., Hinenoya A., Alam M.S., Shima K., Zahid S.H., Shi L., Sugimoto N., Ghosh A.N., Ramamurthy T., Faruque S.M., Nair G.B., and Yamasaki S.** 2007. An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:14483-14488.
10. **Asakura M., Samosornsuk W., Taguchi M., Kobayashi K., Misawa N., Kusumoto M., Nishimura K., Matsuhisa A., and Yamasaki S.** 2007. Comparative analysis of *cytolethal distending toxin (cdt)* genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb. Pathog.* **42**:174-183.
11. **Atamer Z., Dietich J., Müller-Merbach M., Neve H., Heller K.J., and Hinrichs J.** 2008. Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int. Dairy. J.* **19**:228–235.
12. **Bachrach G., Leizerovici-Zigmond M., Zlotkin A., Naor R., and Steinberg D.** 2003. Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**:50-53.
13. **Baggi F., Demarta A., and Peduzzi R.** 2001. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Res. Microbiol.* **152**:743-751.
14. **Bartlett A.V. 3rd, Prado D., Cleary T.G., and Pickering L.K.** 1986. Production of Shiga toxin and other cytotoxins by serogroups of *Shigella*. *J. Infect. Dis.* **154**:996-1002.
15. **Bern C.** 2004. Diarrhoeal Diseases. In *The Global Epidemiology of Infectious Diseases*. ed. Murray C.J.L., Lopez A.D., and Mathers C.D. 1-27. Vol. 4 of *Global Burden of Disease and Injury Series*. Geneva: World Health Organization.
16. **Bertani L.E., and Six E.W.** 1988. The P2-like phages and their parasite, P4. In: *The Bacteriophages*, 2: 73-143, ed. Calendar R. Plenum Press, New York, NY.

17. **Bettstetter M., Peng X., Garrett R.A., and Prangishvili D.** 2003. AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *Acidianus*. *Virology*. **315**:68–79.
18. **Beutin L.** 2006. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*. **53**:299-305.
19. **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.
20. **Bielaszewska M., Fell M., Greune L., Prager R., Fruth A., Tschäpe H., Schmidt M.A., and Karch H.** 2004. Characterization of *cytolethal distending toxin* genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect. Immun.* **72**:1812–1816.
21. **Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Köck R., Fruth A., Bauwens A., Peters G., and Karch H.** 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* **11**:671-676.
22. **Bielaszewska M., Sinha B., Kuczius T., and Karch H.** 2005. Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect. Immun.* **73**:552-562.
23. **Bielaszewska M., Stoewe F., Fruth A., Zhang W., Prager R., Brockmeyer J., Mellmann A., Karch H., and Friedrich A.W.** 2009. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2061–2066.
24. **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. *J. Bacteriol.* **171**:4281-4289.
25. **Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., Alonso A.P., Mora A., Coira M.A., Madrid C., Juárez A., Bernárdez M.I., González E.A., and Blanco J.** 2006. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int. Microbiol.* **9**: 103-110.
26. **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.
27. **Boesze-Battaglia K., Besack D., McKay T., Zekavat A., Otis L., Jordan-Sciutto K., and Shenker B.J.** 2006. Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol.* **8**:823–836.
28. **Bossi L., Fuentes J.A., Mora G., and Figueroa-Bossi N.** 2003. Prophage contribution to bacterial population dynamics. *J. Bacteriol.* **185**:6467-6471.
29. **Boyd E.F., and Brüssow H.** 2002. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.* **10**:521-529.
30. **Breitbart M., Wegley L., Leeds S., Schoenfeld T., and Rohwer F.** 2004. Phage community dynamics in hot springs. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1633–1640.
31. **Brenner D.J., and Falkow S.** 1971. Genetics of the *Enterobacteriaceae*. C. Molecular relationship among members of the *Enterobacteriaceae*. *Adv. Genet.* **16**:81-118.

32. **Brunder W., Khan A.S., Hacker J., and Karch H.** 2001. Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. *Infect. Immun.* **69**:4447-4457.
33. **Brüssow H., Canchaya C., and Hardt W.D.** 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:560–602.
34. **Brzuszkiewicz E., Schuldtes J., Leimbach A., Liesegang H., Meyer F.D., Boelter J., Petersen H., Gottschalk G., and Daniel R.** 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch. Microbiol.* **193**:883-891.
35. **Buchholz U., Bernard H., Werber D., Böhmer M.M., Remschmidt C., Wilking H., Deleré Y., an der Heiden M., Adlhoch C., Dreesman J., Ehlers J., Ethelberg S., Faber M., Frank C., Fricke G., Greiner M., Höhle M., Ivarsson S., Jark U., Kirchner M., Koch J., Krause G., Lubert P., Rosner B., Stark K., and Kühne M.** 2011. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N. Engl. J. Med.* **365**:1763-1770.
36. **Bullas L.R., Mostaghimi A.R., Arensdorf J.J., Rajadas P.T., and Zuccarelli A.J.** 1991. Salmonella phage PSP3, another member of the P2-like phage group. *Virology.* **185**:918-921.
37. **Buzrul S., Öztürk P., Alpas H., and Akcelik M.** 2007. Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages. *LWT* **40**:1671–1677.
38. **Cairns B.J., Timms A.R., Jansen V.A.A., Connerton I.F., and Payne R.J.H.** 2009. Quantitative models of *in vitro* bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathog.* **5**:1-10.
39. **Caldeira J.C., and Peabody D.S.** 2007. Stability and assembly *in vitro* of bacteriophage PP7 virus-like particles. *J. Nanobiotechnol.* **5**:1–10.
40. **Canchaya C., Fournous G., and Brüssow H.** 2004. The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol. Microbiol.* **531**:9-18.
41. **Canchaya C., Proux C., Fournous G., Bruttin A., and Brüssow H.** 2003. Prophage genomics. *Microbiol. Mol. Biol.* **67**:238-276.
42. **Cangelosi G.A., Freitag N.E., and Buckley M.R.** 2004. From outside to inside: environmental microorganisms as human pathogens. *American Academy of Microbiology Report.* ASM, Washington, DC.
43. **Canton R.** 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin. Microbiol. Infect.* **1**:20–25.
44. **Caprioli A., Morabito S., Brugère H., and Oswald E.** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* **36**:289-311.
45. **Carey C.M., Kostrzynska M., Ojha S., and Thompson S.** 2008. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Microbiol Methods.* **73**:125-132.
46. **Carlton, R.M.** 1999. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **47**:267-274.

47. **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. *Cell Microbiol.* **2**:1-9.
48. **Chien C.C., Taylor N.S., Ge Z., Schauer D.B., Young V.B., and Fox J.G.** 2000. Identification of *cdtB* homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter spp.* *J. Med. Microbiol.* **49**:525-534.
49. **Clark C.G., Johnson S.T., Easy R.H., Campbell J.L., and Rodgers F.G.** 2002. PCR for detection of *cdt-III* and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2671–2674.
50. **Cope L.D., Lumbley S., Latimer J.L., Klesney-Tait J., Stevens M.K., Johnson L.S., Purven M., Munson Jr R.S., Lagergard T., Radolf J.D., and Hansen E.J.** 1997. A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:4056-4061.
51. **Court D.L., Oppenheim A.B., and Adhya S.L.** 2007. A new look at bacteriophage lambda genetic networks. *J. Bacteriol.* **189**:298-304.
52. **Creuzburg K., Recktenwald J., Kuhle V., Herold S., Hensel M., and Schmidt H.** 2005. The Shiga toxin 1-converting bacteriophage BP-4795 encodes an NleA-like type III effector protein. *J. Bacteriol.* **187**:8494-8498.
53. **Croxen M.A., and Finlay B.B.** 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:26-38.
54. **Cunault C., Pourcher A.M., and Burton C.H.** 2011. Using temperature and time criteria to control the effectiveness of continuous thermal sanitation of piggery effluent in terms of set microbial indicators. *J. Appl. Microbiol.* **111**: 1492-1504.
55. **Czczulin J.R., Balepur S., Hicks S., Philips A., Hall R., Kothary M.H., Navarro-Garcia F., and Nataro J.P.** 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **65**:4135-4145.
56. **Davies-Colley R.J., Donnison A.M., Speed D.J., Ross C.M., and Nagels J.W.** 1999. Inactivation of faecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds: Interactions of environmental factors with sunlight. *Water Res.* **33**:1220-1230.
57. **Dee S.W., and Fogelman J.C.** 1992. Rates of inactivation of waterborne coliphages by monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3136-3141.
58. **De Sablet T., Chassard C., Bernalier-Donadille A., Vareille M., Gobert A.P., and Martin C.** 2009. Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **77**:783-790.
59. **Dodd I.B., Shearwin K.E., and Egan J.B.** 2005. Revisited gene regulation in bacteriophage lambda. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**:145-152.
60. **Dumke R., Schroter-Bobsin U., Jacobs E., and Roske I.** 2006. Detection of phages carrying the *Shiga toxin 1* and *2* genes in waste water and river water samples. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**:48-53.
61. **Durán A.E., Muniesa M., Méndez X., Valero F., Lucena F., and Jofre J.** 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* **92**:338-347.
62. **Durán A.E., Muniesa M., Mocé-Llivina L., Campos C., Jofre J., and Lucena F.** 2003. Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. *J. Appl. Microbiol.* **95**:29-37.

63. **Elliott S.J., Wainwright L.A., McDaniel T.K., Jarvis K.G., Deng Y.K., Lai L.C., McNamara B.P., Donnenberg M.S., and Kaper J.B.** 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* **28**:1–4.
64. **Elwell C.A., and Dreyfus L.A.** 2000. DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol. Microbiol.* **37**:952-963.
65. **Erickson M.C., and Doyle M.P.** 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* **70**:2426–2449.
66. **Esposito D., Fitzmaurice W.P., Benjamin R.C., Goodman S.D., Waldman A.S., and Scocca J.J.** 1996. The complete nucleotide sequence of bacteriophage HP1 DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**:2360-2368.
67. **Feinbaum R.** 1998. Vectors derived from plasmids. *Current protocols in molecular biology*. Section II, unit 1.5.
68. **Ford M.E., Sarkis G.J., Belanger A.E., Hendrix R.W., and Hatfull G.F.** 1998. Genoma structure of mycobacteriophage D29: implications for phage evolution. *J. Mol. Biol.* **279**:143-164.
69. **Franki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L., and Brown F.** 1991. Classification and nomenclature of viruses. 5th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2. Springer-Verlag. Vienna, Austria.
70. **Fraser M.E., Fujinaga M., Melton-Celsa A.R., Twiddy E.M., and O'Brien A.D.** 2004. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* **279**:27511-27517.
71. **Freeman V.J.** 1951. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacteria diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **61**: 675-688.
72. **Friedrich A.W., Lu S., Bielawszewska M., Prager R., Bruns P., Xu J.G., Tschäpe H., and Karch H.** 2006. Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1844–1846.
73. **Fuchs, S., Mühldorfer, I., Donohue-Rolfe, A., Kerényi, M., Emödy, L., Alexiev, R., Nenkov P., and Hacker J.** 1999. Influence of RecA on *in vivo* virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb. Pathog.* **27**:13-23.
74. **Galli L., Miliwebsky E., Irino K., Leotta G., and Rivas M.** 2009. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans. *Vet. Microbiol.* **143**:307-313.
75. **García-Aljaro C.** 2004. Thesis: “Detección del gen *stx*<sub>2</sub> en muestras ambientales y evaluación de su variabilidad”. UB
76. **García-Aljaro C., Muniesa M., Jofre J., and Blanch A.R.** 2008. Genotypic and phenotypic diversity among induced, *stx*<sub>2</sub>-carrying bacteriophages from environmental *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:329-336.
77. **Gargi A., Reno M., and Blanke S.R.** 2012. Bacterial toxin modulation of the eukaryotic cell cycle: are all cytolethal distending toxins created equally? *Front Cell Infect. Microbiol.* **2**:124. doi: 10.3389/fcimb.2012.00124.
78. **Garmendia J., Frankel G., and Crepin V.F.** 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* **73**:2573-2585.

79. **Garmendia J., Phillips A.D., Carlier M.F., Chong Y., Schüller S., Marches O., Dahan S., Oswald E., Shaw R.K., Knutton S., and Frankel G.** 2004. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol.* **6**:1167-1183.
80. **Ge Z., Feng Y., Whary M.T., Nambiar P.R., Xu S., Ng V., Taylor N.S., and Fox J.G.** 2005. Cytolethal distending toxin is essential for *Helicobacter hepaticus* colonization in outbred Swiss Webster mice. *Infect. Immun.* **73**:3559-3567.
81. **Ge Z., Schauer D.B., and Fox J.G.** 2008. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell. Microbiol.* **10**:1599-1607.
82. **Golec P., Dabrowski K., Hejnowicz M., Gozdek A., Łoś J.M., Węgrzyn G., Łobocka M., and Łoś M.** 2011. A reliable method for storage of tailed phages. *J. Microbiol. Meth.* doi:10.1016/j.mimet.2011.01.007
83. **Gómez-Sanz E., Kadlec K., Feßler A.T., Zarazaga M., Torres C., and Schwarz S.** 2013. Novel erm(T)-carrying multiresistance plasmids from porcine and human isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 that also harbour cadmium and copper resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:3275-3282.
84. **Gonzalez J.M., Sherr E.B., and Sherr B.F.** 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:583-589.
85. **Grif K., Dierich M.P., Karch H., and Allerberger F.** 1998. Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**:761-766.
86. **Gyles C.L.** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* **85**:E45-62.
87. **Hacker J., Blum-Oehler G., Mühldorfer I., and Tschäpe H.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**:1089-1097.
88. **Haghjoo E., and Galán J.E.** 2004. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:4614-4619.
89. **Hanlon GW.** 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **30**:118-128.
90. **Hansen V.M., Rosenquist H., Baggesen D.L., Brown S., and Christensen B.B.** 2007. Characterization of *Campylobacter* phages including analysis of host range by selected *Campylobacter* Penner serotypes. *BMC Microbiology.* **7**:90-99.
91. **Haque Q.M., Sugiyama A., Iwade Y., Midorikawa Y., and Yamauchi T.** 1996. Diarrheal and environmental isolates of *Aeromonas* spp. produce a toxin similar to Shiga-like toxin 1. *Curr. Microbiol.* **32**:239-245.
92. **Harrington S.M., Dudley E.G., and Nataro J.P.** 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**:12-18.
93. **Hatfull G.F., and Sarkis G.J.** 1993. DNA sequence, structure and gene expression of mycobacteriophage L5: a phage system for mycobacterial genetics. *Mol. Microbiol.* **7**:395-405.
94. **Hendrix R.W.** 2002. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor. Popul. Biol.* **61**:471-480.

95. **Hendrix R.W.** 2003. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:506-511.
96. **Hendrix R.W., Smith M.C.M., Burns R.N., Ford M.E., and Hatfull G.F.** 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:2192–2197.
97. **Herold S., Karch H., and Schmidt H.** 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**:115-121.
98. **Herold S., Paton J.C., and Paton A.W.** 2009. Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation. *Infect. Immun.* **77**:3234-3243.
99. **Heskowitz I., and Hagen D.** 1980. The lysis-lysogeny decision of phage lambda: explicit programming and responsiveness. *Ann. Rev. Genet.* **14**:399-445.
100. **Heywood W., Henderson B., and Nair S.P.** 2005. Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. *J. Med. Microbiol.* **54**:207-216.
101. **Imamovic L., Ballesté E., Jofre J., and Muniesa M.** 2010. Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:5693-5701.
102. **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.
103. **Imamovic L., and Muniesa M.** 2012. Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PloS One.* **7**:e32393.
104. **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. *J. Appl. Microbiol.* **108**:1105-1114.
105. **James C.E., Stanley K.N., Allison H.E., Flint H.J., Stewart C.S., Sharp R.J., Saunders J.R., and McCarthy A.J.** 2001. Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4335-4337.
106. **Janka A., Bielaszewska M., Dobrindt U., Greune L., Schmidt M.A., and Karch H.** 2003. *Cytolethal distending toxin* gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect. Immun.* **71**:3634-3638.
107. **Jinadasa R.N., Bloom S.E., Weiss R.S., and Duhamel G.E.** 2011. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology.* **157**:1851-1875.
108. **Johannes L., and Römer W.** 2010. Shiga toxins-from cell biology to biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:105-116.
109. **Johnson W.M., and Lior H.** 1987. Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:19-23.
110. **Johnson W.M., and Lior H.** 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb. Pathog.* **4**:103-113.
111. **Johnson W.M., and Lior H.** 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter spp.* *Microb. Pathog.* **4**:115-126.
112. **Jończyk E., Kłak M., Międzybrodzki R., and Górski A.** 2011. The influence of external factors on bacteriophages--review. *Folia Microbiol. (Praha).* **56**:191-200.

113. **Jores J., Zehmke K., Eichberg J., Rumer L., and Wieler L.H.** 2003. Description of a novel intimin variant (type zeta) in the bovine O84:NM verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. *Exp. Biol. Med.* **228**:370-376.
114. **Kameyama L., Fernandez L., Bermudez R.M., Garcia-Mena J., Ishida C., and Guarueros G.** 2001. Properties of a new coliphage group from human intestinal flora. *Rec. Res. Develop. Virol.* **3**:297–303.
115. **Kaper J.B., Nataro J.P., and Mobley H.L.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123-140.
116. **Karch H., Denamur E., Dobrindt U., Finlay B.B., Hengge R., Johannes L., Ron E.Z., Tønjum T., Sansonetti P.J., and Vicente M.** 2012. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol. Med.* **4**:841-848.
117. **Karmali M.A.** 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**:15-38.
118. **Keller R., and Traub N.** 1974. The characterization of *Bacteroides fragilis* bacteriophage recovered from animal sera: observations on the nature of bacteroides phage carrier cultures. *J. Gen. Virol.* **24**:179-189.
119. **Kerby G.P., Godwy R.A., Dillon E.S., Dillon M.L., Csáky T.Z., Sharp D.G., and Beard J.W.** 1949. Purification, pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J. Immunol.* **63**:93–107.
120. **Kim J.H., Kim J.C., Choo Y.A., Jang H.C., Choi Y.H., Chung J.K., Cho S.H., Park M.S., and Lee B.K.** 2009. Detection of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients in Republic of Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**:525-529.
121. **Kimmit P.T., 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. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:458-465.
122. **King L.A., Nogareda F., Weill F.X., Mariani-Kurkdjian P., Loukiadis E., Gault G., Jourdan-DaSilva N., Bingen E., Macé M., Thevenot D., Ong N., Castor C., Noël H., Van Cauteren D., Charron M., Vaillant V., Aldabe B., Goulet V., Delmas G., Couturier E., Le Strat Y., Combe C., Delmas Y., Terrier F., Vendrely B., Rolland P., and de Valk H.** 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. *Clin. Infect. Dis.* **54**:1588-1594.
123. **Kłak M., Międzybrodzki R., Bubak B., Jończyk E., Weber-Dąbrowska B., and Górski A.** 2010. Studies on the gastrointestinal transit and blood penetration of a therapeutic staphylococcal bacteriophage. Abstract no. 209, First International Congr. Viruses of Microbes, Paris.
124. **Klem J., Dömötör D., Schneider G., Kóvacs T., Tóth A., and Rákhely G.** 2013. Bacteriophage therapy against staphylococci. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **60**:411-422.
125. **Knutton S., Shaw R.K., Bhan M.K., Smith H.R., McConnell M.M., Cheasty T., Williams P.H., and Baldwin T.J.** 1992. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere *in vitro* to human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* **60**:2083-2091.
126. **Kobiler O., Rokney A., Friedman N., Court D.L., Stavans J., and Oppenheim A.B.** 2005. Quantitative kinetic analysis of the bacteriophage lambda genetic network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:4470-4475.
127. **Köhler B., Karch H., and Schmidt H.** 2000. Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting



- bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. *Microbiology*. **146**:1085-1090.
128. **Konczy P., Ziebell K., Mascarenhas M., Choi A., Michaud C., Kropinski A.M., Whittam T.S., Wickham M., Finlay B., and Karmali M.A.** 2008. Genomic O island 122 locus for enterocyte effacement, and the evolution of virulent verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**:5832-5840.
  129. **Konowalchuk J., Speirs J.I., and Stavric S.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **18**:775-779.
  130. **Laing C.R., Zhang Y., Gilmour M.W., Allen V., Johnson R., Thomas J.E., and Gannon V.P.** 2012. A comparison of Shiga-toxin 2 bacteriophage from classical enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes and the German *E. coli* O104:H4 outbreak strain. *PLoS One*. **7**:e37362.
  131. **Lark K.G., and Adams M.H.** 1953. The stability of phages as a function of the ionic environment. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **18**:171–183.
  132. **Lasobras J., Muniesa M., Lucena F., and Jofre J.** 1997. Relationship between the morphology of bacteriophages and their persistence in the environment. *Water Sci. Tech.* **35**:129–132.
  133. **Lecion D., Fortuna W., Dabrowska K., Miedzybrodzki R., Weber-Dabrowska B., and Górski A.** 2013. Application of microbiological quantitative methods for evaluation of changes in the amount of bacteria in patients with wounds and purulent fistulas subjected to phage therapy and for assessment of phage preparation effectiveness (*in vitro* studies). *Adv. Med. Sci.* **2**:1-8.
  134. **Lederberg J.** 1998. Plasmid (1952-1997). *Plasmid*. **39**:1-9.
  135. **Lee H.S., and Sobsey M.D.** 2011. Survival of prototype strains of somatic coliphage families in environmental waters and when exposed to UV low-pressure monochromatic radiation or heat. *Water Res.* **45**:3723-3734.
  136. **Leung P.H., Peiris J.S., Ng W.W., Robins-Browne R.M., Bettelheim K.A., and Yam W.C.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7549-7553.
  137. **Levine M.M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:377-389.
  138. **Lin L., Honh W., Ji X., Han J., Huang L., and Wei Y.** 2010. Isolation and characterization of an extremely long tail *Thermus* bacteriophage from Tegchong hot springs in China. *J. Basic Microbiol.* **50**:452–456.
  139. **Lindahl G., and Sunshine M.** 1972. Excision-deficient mutants of bacteriophage P2. *Virology*. **49**:180-187.
  140. **Little J.W.** 1984. Autodigestion of *lexA* and phage  $\lambda$  repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**:1375-1379.
  141. **Little J.W., Shepley D.P., and Wert D.W.** 1999. Robustness of a gene regulatory circuit. *EMBO J.* **18**:4299-4307.
  142. **Loukiadis E., Nobe R., Herold S., Tramuta C., Ogura Y., Ooka T., Morabito S., Kérourédan M., Brugère H., Schmidt H., Hayashi T., and Oswald E.** 2008. Distribution, functional expression, and genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**:275-285.

143. **Lu Z., Breidt F., Plengvidhya V., and Fleming H.P.** 2003. Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3192–3202.
144. **Lucena F., Ribas F., Duran A.E., Skraber S., Gantzer C., Campos C., Morón A., Calderón E., and Jofre J.** 2006. Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. *J. Appl. Microbiol.* **101**:96-102.
145. **Lundqvist B., and Bertani G.** 1984. Immunity repressor of bacteriophage P2. Identification and DNA-binding activity. *J. Mol. Biol.* **178**:629-651.
146. **Margall N., Domínguez A., Prats G., and Salleras L.** 1997. Gastro-hemorrhagic *Escherichia coli*. *Rev. Esp. Salud Pública.* **71**:437-443.
147. **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. Reports.* **4**:147-155.
148. **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.
149. **Mauro S.A., Opalko A., Lindsay K., Colon M.P., and Koudelka G.B.** 2013. The microcosm mediates the persistence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in freshwater ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:4821-4828.
150. **Mayer M.P., Bueno L.C., Hansen E.J., and DiRienzo J.M.** 1999. Identification of a *cytolethal distending toxin* gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **67**:1227-1237.
151. **McDaniel T.K., Jarvis K.G., Donnenberg M.S., and Kaper J.B.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:1664-1668.
152. **Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., and Tauxe R.V.** 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:841-842.
153. **Melton-Celsa A., Mohawk K., Teel L., and O'Brien A.** 2012. Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **357**:67-103.
154. **Meng J., Zhao S., and Doyle M.P.** 1998. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. *Int. J. Food Microbiol.* **45**:229-235.
155. **Miller R.V.** 2004. Bacteriophage-mediated transduction: an engine for change and evolution. In Miller R.V. and Day M.J. *Microbial evolution, gene establishment survival and exchange.* ASM Press. Washington DC. p. 144 - 156.
156. **Mocé-Llivina L., Muniesa M., Pimenta-Vale H., Lucena F., and Jofre J.** 2003. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1452–1456.
157. **Mongkolsuk S., Vattanaviboon P., Rabibhadana S., and Kiatpapan P.** 1993. Versatile gene cassette plasmids to facilitate the construction of generalized and specialized cloning vectors. *Gene.* **124**:131-132.
158. **Moore M.A., Blaser M.J., Perez-Perez G.I., and O'Brien A.D.** 1988. Production of a Shiga-like cytotoxin by *Campylobacter*. *Microb. Pathog.* **4**:455-462.
159. **Mora A., Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., López C., Justel P., Alonso M.P., Echeita A., Bernández M.I., González E.A., and Blanco J.** 2007. Serotypes, virulence genes and

- intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiol.* 1:7-13.
160. **Mühldorfer I., Hacker J., Keusch G.T., Acheson D.W.K., Tschaepé H., Kane A. V., Ritter A., Olschläger T., and Donohue-Rolfe A.** 1996. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**:495–502.
  161. **Mullan W.M.A.** 2001. Bacteriophage isolation and purification. [On-line] UK. <http://www.dairyscience.info/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html>.
  162. **Müller-Merbach M., Rauscher T., and Hinrichs J.** 2004. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *Int. Dairy J.* **15**:777–784.
  163. **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.
  164. **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. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:4065-4073.
  165. **Muniesa M., and Jofre J.** 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2443-2448.
  166. **Muniesa M., and Jofre J.** 2004. Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **86**:65-76.
  167. **Muniesa M., Lucena F., and Jofre J.** 1999a. Comparative survival of free shiga toxin 2-encoding phages and *Escherichia coli* strains outside the gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5615-5618.
  168. **Muniesa M., Lucena F., and Jofre J.** 1999b. Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *J. Appl. Microbiol.* **87**:402-409.
  169. **Muniesa M., Mocé-Llivina L., Katayama H., and Jofre J.** 2003. Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **83**:305-315.
  170. **Muniesa M., Recktenwald J., Bielaszewska M., Karch H., and Schmidt H.** 2000. Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* **68**:4850-4855.
  171. **Muniesa M., Schembri M.A., Hauf N., Chakraborty T.** 2006. Active genetic elements present in the locus of enterocyte effacement in *Escherichia coli* O26 and their role in mobility. *Infect. Immun.* **74**:4190-4199.
  172. **Muniesa M., and Schmidt H.** 2014. Shiga toxin-encoding phages: multifunctional gene ferries. Horizon Scientific Press and Caister Academic Press. Chapter 4. In press.
  173. **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.
  174. **Nakayama K., Kanaya S., Ohnishi M., Terawaki Y., and Hayashi T.** 1999. The complete nucleotide sequence of FCTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for phage evolution and horizontal transfer via bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **31**:399-419.
  175. **Nasser A., and Oman S.** 1999. Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Res.* **33**:1748–1752.

176. **Nataro J.P., Deng Y., Maneval D.R., German A.L., Martin W.C., and Leviene M.M.** 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect. Immun.* **60**:2297-2304.
177. **Nataro J.P., and Kaper J.B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142-201.
178. **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.
179. **Nesvera J., Hochmannová J, and Pátek M.** 1998. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**:391-395.
180. **Nilsson A.S., and Haggård-Ljungquist E.** 2007. Evolution of P2-like phages and their impact on bacterial evolution. *Res. Microbiol.* **158**:311-317.
181. **Nilsson A.S., Karlsson J.L., and Haggård-Ljungquist E.** 2004. Site-specific recombination links the evolution of P2-like coliphages and pathogenic enterobacteria. *Mol. Biol. Evol.* **21**:1-13.
182. **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. **19**:182.
183. **Noris M., Mescia F., and Remuzzi G.** 2012. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat. Rev. Nephrol.* **8**:622-633.
184. **Nougayrède J.P., Taieb F., De Rycke J., and Oswald E.** 2005. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol.* **13**:103-110.
185. **O'Brien A.D., and Kaper J.** 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Yesterday, today and tomorrow. J. Kaper and A.D. O'Brien eds. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. 1-11. ASM press, Washington, D.C.
186. **O'Brien A.D., LaVeck G.D., Thompson M.R., and Formal S.B.** 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **146**:763-769.
187. **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.* **226**:694-696.
188. **O'Brien A.D., Thompson M.R., Gemski P., Doctor B.P., and Formal S.B.** 1977. Biological properties of *Shigella flexneri* 2A toxin and its serological relationship to *Shigella dysenteriae* 1 toxin. *Infect. Immun.* **15**:796-798.
189. **Odegrip R., Nilsson A.S., and Haggård-Ljungquist E.** 2006. Identification of a gene encoding a functional reverse transcriptase within a highly variable locus in the P2-like coliphages. *J. Bacteriol.* **188**:1643-1647.
190. **Ohara M., Oswald E., and Sugai M.** 2004. Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. *J. Biochem.* **136**:409-413.
191. **Okuda J., Kurazono H., and Takeda Y.** 1995. Distribution of the *cytolethal distending toxin A* gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb. Pathog.* **18**:167-172.
192. **O'Loughlin E.V., and Robins-Browne R.M.** 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* **3**:493-507.

193. **Olson M.R., Axler R.P., and Hicks R.E.** 2004. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *J. Virol. Meth.* **122**:147–152.
194. **Oppenheim A.B., Kobiler O., Stavans J., Court D.L., and Adhya S.** 2005. Switches in bacteriophage lambda development. *Annu. Rev. Genet.* **39**:409-429.
195. **Orth D., Grif K., Dierich M.P., and Würzner R.** 2006. Cytolethal distending toxins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: alleles, serotype distribution and biological effects. *Journal Med. Microbiol.* **55**:1487-1492.
196. **Pacheco A.R., and Sperandio V.** 2009. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:192–198.
197. **Panhotra B.R., and Agarwal K.C.** 1981. Plasmids carrying genes for enterotoxin production and drug resistance in *Escherichia coli* of human origin. *Indian J. Med. Res.* **74**:652-655.
198. **Paton J.C., and Paton A.W.** 1996. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **34**:463–465.
199. **Paton J.C., and Paton A.W.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:450–479.
200. **Paton A.W., Srimanote P., Woodrow M.C., and Paton J.C.** 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesion produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* **69**:6999-7009.
201. **Paton A.W., Voss E., Manning P.A., and Paton J.C.** 1998. Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* to human intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Microb. Pathog.* **24**:57-63.
202. **Pérès S.Y., Marchès O., Daigle F., Nougayrède J.P., Herault F., Tasca C., De Rycke J., and Oswald E.** 1997. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* **24**:1095-1107.
203. **Perna N.T., Mayhew G.F., Pósfai G., Elliott S., Sonnenberg M.S., Kaper J.B., and Blattner F.R.** 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **66**:3810-1817.
204. **Pickett C.L., Cottle D.L., Pesci E.C., and Bikah G.** 1994. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect. Immun.* **62**:1046-1051.
205. **Pickett C.L., Pesci E.C., Cottle D.L., Russell G., Erdem A.N., and Zeytin H.** 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter sp.* *cdtB* gene. *Infect. Immun.* **64**:2070-2078.
206. **Pickett C.L., and Whitehouse C.A.** 1999. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol.* **7**:292-297.
207. **Prigent M., Leroy M., Confalonieri F., Dutertre M., and DuBow M.S.** 2005 A diversity of bacteriophages forms and genomes can be isolated from the surface sands of Sahara Desert. *Extremophiles.* **9**:289–296.
208. **Rangel J.M., Sparling P.H., Crowe C., Griffin P.M., and Swerdlow D.L.** 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:603-609.

209. **Recktenwald J., and Schmidt H.** 2002. The nucleotide sequence of Shiga toxin (Stx) 2e-encoding phage ΦP27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. *Infect. Immun.* **70**:1896-1908.
210. **Rendón M.A., Saldaña Z., Erdem A.L., Monteiro-Neto V., Vázquez A., Kaper J.B., Puente J.L., and Girón J.A.** 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:10637-10642.
211. **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. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:5336-5341.
212. **Rodríguez-Rubio L., Martínez B., Donovan D.M., Rodríguez A., and García P.** 2013a. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. *Crit. Rev. Microbiol.* **39**:427-434.
213. **Rodríguez-Rubio L., Martínez B., Donovan D.M., García P., and Rodríguez A.** 2013b. Potential of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 and its derivative fusion proteins in milk biopreservation. *PLoS One.* **8**:e54828.
214. **Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Hebert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., and Cohen M.L.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl. J. Med.* **12**:681-685.
215. **Sabaté M., and Prats G.** 2002. Structure and function of integrons. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **20**:341-345.
216. **Saha S., Haggård-Ljungquist E., and Nordström K.** 1987. The Cox protein of bacteriophage P2 inhibits the formation of the repressor protein and autoregulates the early operon. *EMBO J.* **6**: 3191–3199.
217. **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. *Environ. Microbiol.* **11**:1815-1826.
218. **Sambrook J., and Russell D.W.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
219. **Scheutz F., Teel L.D., Beutin L., Piérard D., Buvens G., Karch H., Mellmann A., Caprioli A., Tozzoli R., Morabito S., Strockbine N.A., Melton-Celsa A.R., Sanchez M., Persson S., O'Brien A.D.** 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **50**:2951-2963.
220. **Schmidt H., Beutin L., and Karch H.** 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain 933. *Infect. Immun.* **63**:1055-1063.
221. **Schmidt H., Montag M., Bockemuhl J., Heesemann J., and Karch H.** 1993. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect. Immun.* **61**:534-543.
222. **Schmidt H., Scheef J., Huppertz H.I., Frosch M., and Karch H.** 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H(-) strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3491-3496.
223. **Schmidt M.A.** 2010. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell. Microbiol.* **12**:1544-1552.

224. **Schubert R.A., Dodd I.B., Egan J.B., and Shearwin K.E.** 2007. Cro's role in the CI Cro bistable switch is critical for lambda's transition from lysogeny to lytic development. *Genes Dev.* **21**:2461-2472.
225. **Scott D.A., and Kaper J.B.** 1994. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **62**:244-251.
226. **Sears C.L., and Kaper J.B.** 1996. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Revs.* **60**:167-215.
227. **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. *J. Bacteriol.* **189**:6645-6654.
228. **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. *J. Bacteriol.* **190**:4722-4735.
229. **Shaikh N., and Tarr P.I.** 2003. *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* **185**:3596-3605.
230. **Shima A., Hinenoya A., Asakura M., Sugimoto N., Tsukamoto T., Ito H., Nagita A., Faruque S.M., and Yamasaki S.** 2012. Molecular characterizations of cytolethal distending toxin produced by *Providencia alcalifaciens* strains isolated from patients with diarrhea. *Infect. Immun.* **80**:1323-1332.
231. **Smith H.W., Green P., and Parsell Z.** 1983. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *J. Gener. Microbiol.* **129**:3121-3137.
232. **Smith J.L., and Bayles D.O.** 2006. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Critical Rev. Microbiol.* **32**:227-248.
233. **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.
234. **Stenutz R., Weintraub A., and Widmalm G.** 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:382-403.
235. **Stolfa G., and Koudelka G.B.** 2012. Entry and killing of *Tetrahymena thermophila* by bacterially produced Shiga toxin. *Mbio.* **4**:e00416-12.
236. **Strockbine N.A., Marques L.R., Newland J.W., Smith H.W, Holmes R.K., and O'Brien A.D.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* **53**:135-140.
237. **Sváb D., Horvath B., Maroti G., Dobrindt U., and Tóth I.** 2013. Sequence variability of P2-like prophage genomes carrying the cytolethal distending toxin V operon in *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:4958-4964.
238. **Svensson L.A., Henning P., and Lagergård T.** 2002. The cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* inhibits endothelial cell proliferation. *Infect. Immun.* **70**:2665-2669.
239. **Tarr P.I.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7 clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1-10.
240. **Tartera C., and Jofre J.** 1987. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1632-1637.

241. **Tey B.T., Ooi S.T., Yong K.C., Tan Ng M.Y., Ling T.C., and Tan W.S.** 2009. Production of fusion m13 phage bearing the disulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. *J. African Biotechnol.* **8**:268–273.
242. **Thelestam M., and Frisan T.** 2004. Cytolethal distending toxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**:111–133.
243. **Thierauf A., Perez G., and Maloy A.S.** 2009. Generalized transduction. *Methods Mol. Biol.* **501**:267-286.
244. **Thorne C.B., and Holt S.C.** 1974. Cold liability of *Bacillus cereus* bacteriophage CP-51. *J. Virol.* **14**:1006–1012.
245. **Tilden J. Jr., Young W., McNamara A.M., Custer C., Boesel B., Lambert-Fair M.A., Majkowski J., Vugia D., Werner S.B., Hollingsworth J., and Morris J.G. Jr.** 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health.* **86**:1142- 1145.
246. **Tinsley C.R., Bille E., and Nassif X.** 2006. Bacteriophages and pathogenicity: more than just providing a toxin?. *Microbes Infect.* **8**:1365-1371.
247. **Tobe T., Beatson S.A., Taniguchi H., Abe H., Bailey C.M., Fivian A., Younis R., Matthews S., Marches O., Frankel G., Hayashi T., and PallenM.J.** 2006. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:14941-14946.
248. **Tomalsky M., Actis L., and Jorge C.** 1992. Plasmids. *Enciclopedia of Microbiology.* 3:431-442.
249. **Toshima H., Yoshimura A., Arikawa K., Hidaka A., Ogasawara J., Hase A., Masaki H., and Nishikawa Y.** 2007. Enhancement of Shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:7582-7588.
250. **Tóth I., Csík M., and Emódy L.** 2003. Spontaneous antibiotic resistance mutation associated pleiotropic changes in *Escherichia coli* O157:H7. *Acta Vet. Hung.* **51**:29-44.
251. **Tóth I., Héroult F., Beutin L., and Oswald E.** 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *Journal Clin. Microbiol.* **41**:4285-4291.
252. **Tóth I., Nougayrède J.P., Dobrindt U., Ledger T.N., Boury M., Morabito S., Fujiwara T., Sugai M., Hacker J., and Oswald E.** 2009. *Cytolethal distending toxin* type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **77**:492-500.
253. **Trofa A.F., Ueno-Olsen H., Oiwa R., and Yoshikawa M.** 1999. Dr.Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. *Clin. Infect. Dis.* **29**:1303-1306.
254. **Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., McGeoch D.J., Maniloff J., Mayo M.A., Pringle C.R., and Wickner R.B.** 2000. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses.* Seventh ICTV Report, Academic Press.
255. **Voloshin O.N., Ramirez B.E., Bax A., and Camerini-Otero R.D.** 2001. A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: a negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA. *Genes Dev.* **15**:415-427.
256. **Venturini C., Hassan K.A., Roy Chowdhury P., Paulsen I.T., Walker M.J., and Djordjevic S.P.** 2013. Sequences of two related multiple antibiotic resistance virulence plasmids sharing



- a unique IS26-related molecular signature isolated from different *Escherichia coli* pathotypes from different hosts. PloS. One. **8**:e78862.
257. **Wagner P.L., Acheson D.W.K., and Waldor M.K.** 2001. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Infect. Immun. **69**:1934-1937.
  258. **Wain J., House D., Pickard D., Dougan G., and Frankel G.** 2001. Acquisition of virulence-associated factors by enteric pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. **356**:1027-1034.
  259. **Waldor M.K., Friedman D.I., and Adhya S.L.** 2005. Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology. ASM Press, Washington, DC.
  260. **Wang G., Clark C.G., and Rodgers F.G.** 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. **40**:3613-3619.
  261. **Warren J.C., and Hatch M.T.** 1969. Survival of T3 coliphage in varied extracellular environments. Appl. Microbiol. **17**:256–261.
  262. **Watarai M., Sato T., Kobayashi M., Shimizu T., Yamasaki S., Tobe T., Sasakawa C., and Takeda Y.** 1998. Identification and characterization of a newly isolated shiga toxin 2-converting phage from shiga toxin producing *Escherichia coli*. Infect. Immun. **66**:4100-4107.
  263. **Weinbauer M.G.** 2004. Ecology of Prokariotic viruses. FEMS Microbiol. Rev. **28**:127-181.
  264. **Wells T.J., Sherlock O., Rivas L., Mahajan A., Beatson S.A., Torpdahl M., Webb R.I., Allsopp, L.P., Gobius, K.S., Gally D.L., and Schembri M.A.** 2008. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. Environ. Microbiol. **10**:589-604.
  265. **Whang T., Daly B., and Yin J.** 1996. Metal-ion discrimination by phage T7. J. Inorg. Biochem. **63**:1–7.
  266. **White P.A., Mclver C.J., and Rawlinson W.D.** 2001. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. **45**:2658-2661.
  267. **Whitehouse C.A., Balbo P.B, Pesci E.C., Cottle D.L., Mirabito P.M., and Pickett C.L.** 1998. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. Infect. Immun. **66**:1934–1940.
  268. **Wichels A., Biel S.S., Gelderblom H.R., Brinkhoff T., Muyzer G., and Schutt C.H.** 1998. Bacteriophage diversity in the North Sea. Appl. Environ. Microbiol. **64**:4128–4133.
  269. **Wigginton K.R., Pecson B.M., Sigstam T., Bosshard F., and Kohn T.** 2012. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. Environ. Sci. Technol. **46**:12069-12078.
  270. **Wommack K.E., and Colwell R.R.** 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **64**:69-114.
  271. **World Health Organization.** 1998. Zoonotic non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO scientific working group meeting.
  272. **Xicohtencatl-Cortes J., Monteiro-Neto V., Ledesma M.A., Jordan D.M., Francetic O., Kaper J.B., Puente J.L., and Girón J.A.** 2007. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J. Clin. Inv. **117**:3519-3529.
  273. **Xu X., McAteer S.P., Tree J.J., Shaw D.J., Wolfson E.B., Beatson S.A., Roe A.J., Allison L.J., Chase-Topping M.E., Mahajan A., Tozzoli R., Woolhouse M.E., Morabito S., and**

- Gally D.L.** 2012. Lysogeny with Shiga toxin 2-encoding bacteriophages represses type III secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* **8**:e1002672.
274. **Yamamoto T., Kojio S., Taneike I., Nakagawa S., Iwakura N., and Wakisaka-Saito N.** 2003. <sup>60</sup>Co irradiation of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* induces Stx phage. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**:115-121.
275. **Yang F., Yang J., Zhang X., Chen L., Jiang Y., Yan Y., Tang X., Wang J., Xiong Z., Dong J., Xue Y., Zhu Y., Xu X., Sun L., Chen S., Nie H., Peng J., Xu J., Wang Y., Yuan Z., Wen Y., Yao Z., Shen Y., Qiang B., Hou Y., Yu J., and Jin Q.** 2005. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Res.* **33**:6445-6458.
276. **Yates M.V., Gerba C.P., and Kelley L.M.** 1985. Virus persistence in ground water. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**:778-781.
277. **Yoon S.S., Barrangou-Pouey R., Breidt F. Jr., Klaenhammer T.R., and Fleming H.P.** 2002. Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:973-976.
278. **Young V.B., Chien C.C., Knox K.A., Taylor N.S., Schauer D.B., and Fox J.G.** 2000. Cytolethal distending toxin in avian and human isolates of *Helicobacter pullorum*. *J. Infect. Dis.* **182**:620-623.
279. **Zhang J., Yu C., Krishnaswamy L., and Peterson T.** 2011. Transposable elements as catalysts for chromosome rearrangements. *Methods Mol. Biol.* **701**:315-326.
280. **Zhang X., McDaniel A.D., Wolf L.E., Keusch G.T., Waldor M.K., and Acheson D.W.** 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J. Infect. Dis.* **181**:664-670.
281. **Zinder N.D., and Lederberg J.** 1952. Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* **64**:679-699.

## **7. ANEXOS**



## Anexo 1. Protocolos

### Reacción de PCR:

1) En un tubo de PCR se realizó la siguiente mezcla de reacción:

12.5 µl	Polimerasa (Dream Taq Green PCR Master Mix, Fermentas)
0.5 µl	Cebador up a 30 µM
0.5 µl	Cebador lp a 30 µM
10.5 µl	H <sub>2</sub> O bidestilada estéril
1 µl	ADN bacteriano
25 µl	Volumen final

2) Se realizó la PCR usando el programa adecuado en función de los cebadores y la longitud del fragmento (véase anexos 3 y 4).

### Reacción de secuenciación (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit):

1) En un tubo de PCR se realizó la siguiente mezcla de reacción:

1 µl	Master Mix
1.5 µl	Tampón
1 µl	Cebador a 5 µM
4.5 µl	H <sub>2</sub> O bidestilada estéril
2 µl	ADN bacteriano
10 µl	Volumen final

\*Se realizó una reacción con cada uno de los cebadores (up y lp), según anexo 4.

2) Al acabar la reacción se añadieron 10 µl a cada uno de los tubos de PCR y se enviaron a secuenciar.

### Reacción de qPCR:

1) En un tubo de 1.5 ml se realizó la mezcla de reacción:

10 µl	MasterMix (Taqman Environmental Master Mix 2.0)
1 µl	Mezcla de cebadores y sonda (Taqman)
9 µl	Muestra
20 µl	Volumen final/pocillo

2) Se realizó la qPCR usando el programa descrito en el anexo 4.

**Diseño de la qPCR específica para el gen *cdt*:**

Para empezar, se diseñaron los cebadores específicos, a partir de la secuencia consenso obtenida del alineamiento de diferentes secuencias *cdt* (con el programa BioEdit). De esta manera se podría cuantificar el número de copias presentes en las diferentes muestras. Entonces se procedió a la elaboración de la recta patrón y la realización de los estándares de la siguiente manera:

- 1) Se clonó el gen *cdt* en el vector pGEM-T Easy (Promega, Barcelona, Spain): se usaron células químicamente competentes (DH5 $\alpha$ ) y se realizó el protocolo de transformación descrito más abajo.
- 2) Extracción y purificación del plásmido: se realizó la extracción según el protocolo descrito también más abajo. Ésto permitió recuperar el vector pGEM con el gen *cdt* insertado. 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 un gel de agarosa al 1% con 5  $\mu$ l del producto de purificación.
- 3) Banco de diluciones y obtención de los estándares: con el plásmido purificado anteriormente se realizó un banco de diluciones decimales (número de diluciones en función de la concentración inicial de plásmido) y se hizo una Real Time PCR con éstas (5 o 6 réplicas de cada una). La reacción fue:

<b>Producto</b>	<b>Cantidad/ reacción (<math>V_F = 20 \mu</math>l)</b>
Master Mix	10 $\mu$ l
Cebador	1 $\mu$ l
Muestra (dilución)	9 $\mu$ l

Es importante añadir también un control negativo (H<sub>2</sub>O bidestilada estéril) para comprobar que no hay contaminaciones, y un control positivo (plásmido extraído no diluido).

- 4) Con los resultados obtenidos de los estándares se realizaron los cálculos pertinentes y se elaboró la recta patrón. Así, para calcular el número de copias de gen de la construcción plasmídica (CG) se usó la siguiente fórmula:  

$$[\text{concentración del pGEM-T Easy+ inserto (ng/ } \mu\text{l)} / \text{peso molecular (ng/mol)}] \times 6.022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol} = n^\circ \text{ moléculas de pGEM-T Easy + inserto /}\mu\text{l}$$

Debido a que cada molécula de la construcción contiene una copia del fragmento *cdt*, se calculó que 1  $\mu$ l de nuestro stock contenía  $5.24 \times 10^{10}$  CG.

- 5) Una vez obtenida la recta patrón, se realizó la Real Time PCR de las muestras y se realizaron los cálculos pertinentes para obtener el número de copias del gen que hay en cada una de ellas.

**Sonda marcada con digoxigenina** (PCR DIG Synthesis Kit, Roche):

- 1) En un tubo de PCR se realizó la siguiente mezcla de reacción:

0.75 $\mu$ l	Taq polimerasa (1)
5 $\mu$ l	DIG Mix (2)
5 $\mu$ l	Tampón + MgCl <sub>2</sub> (3)
1 $\mu$ l	Cebador up
1 $\mu$ l	Cebador lp
33.25 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O bidestilada estéril
4 $\mu$ l	ADN bacteriano
<hr/>	
50 $\mu$ l	Volumen final

- 2) Se realizó la PCR según el programa adecuado en función de los cebadores.

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

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

Después de realizar varios lavados, se aplicó un tampón que contenía una sonda específica para la región del genoma que se quiso detectar, marcada con digoxigenina, que se incorporó mediante una reacción de PCR donde en la mezcla de reacción habían dUTPs con digoxigenina.

El revelado se realizó con un anticuerpo específico para 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). El protocolo detallado es el siguiente:

1) Transferencia de colonias y lisis bacteriana

- a) Las colonias bacterianas se transfirieron a una membrana de nylon con gran afinidad por los ácidos nucleicos (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham<sup>®</sup>). La placa de agar con colonias/ estrías se mantuvo en contacto con la membrana durante dos minutos, para favorecer una completa transferencia.
- b) Se colocó la membrana (siempre boca arriba) en papel Whatman<sup>®</sup> 3mm empapado con tampón de desnaturalización durante 20 min y luego se secó la membrana sobre papel de nitrocelulosa 5 min.
- c) Se transfirió la membrana sobre nuevo papel Whatman<sup>®</sup> con Tritón-NaOH durante 10 min, y se dejó secar de nuevo 5 min sobre papel.
- d) Se empapó papel Whatman<sup>®</sup> con tampón de neutralización y se colocó encima la membrana 10 min. Se secó la membrana durante 5 min.
- e) Se lavó la membrana 5 min con 2XSSC en agitación y luego se dejó secar 5 min más.
- f) 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.
- g) 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 papel de celofán.

2) Eliminación de los restos celulares

- a) La membrana se lavó con 2XSSC+1% SDS a 50°C en agitación 20 min.
- b) El segundo paso fue el lavado con 2XSSC+0,1% SDS, 10 min a temperatura ambiente en agitación.
- c) 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 (10 µl sonda específica / 50 ml tampón de pre-hibridación). La hibridación se realizó a 64°C, en agitación y o/n.

#### 5) Lavado y reacción colorimétrica

- a) Se realizaron dos lavados de 5 min a temperatura ambiente y agitación con 2XSSC+0,1% SDS.
- b) Después, la membrana se lavó 2 veces a 64°C en 0,04XSSC+0,1% SDS, 15 min.
- c) A continuación se trató 5 min con tampón 1, en agitación.
- d) Entonces se puso en tampón 2 y se incubó 30 min, también en agitación.
- e) 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.
- f) Para eliminar el exceso de anticuerpo, se lavó 2 veces (15'x2) con tampón de lavado.
- g) La membrana se puso en tampón 3 (preparado al momento) durante 5 min para equilibrarse.
- h) 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 o una placa de Petri estéril). Se incubó al menos 2 h en oscuridad para poder visualizarse la reacción colorimétrica. Las zonas de la membrana que se corresponden con colonias/estrías positivas viran a un color azul-violeta.

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

El proceso es prácticamente igual al “colony blot”, transfiriendo a membrana e hibridando con la sonda específica para luego detectarla con una solución cromática, pero con la excepción de que no se realizan algunos de los lavados intermedios, necesarios en el caso de tener colonias aisladas. Así pues:

- 1) Se colocó la membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham®) sobre la placa durante 5 min para la transferencia de las calvas de lisis.
- 2) Después se colocó la membrana sobre papel Whatman® 3 mm empapado en tampón de desnaturalización 5 min y luego se secó sobre papel de nitrocelulosa 5 min.
- 3) Se transfirió la membrana a un nuevo papel Whatman® con tampón de neutralización durante 5 min. Se dejó secar de nuevo 5 min.
- 4) La membrana se lavó con 2XSSC 5 min y luego se dejó secar.
- 5) En este punto se añadió el control positivo (1-2 µl de producto de PCR) en un extremo de la membrana y se dejó secar.
- 6) El ADN se fijó con UV 2 min por cada cara (primero la cara inferior). 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.

### **Transformación y clonaje en pGEM-T Easy** (Promega):

#### **En células químicamente competentes:**

- 1) Realizar la reacción de ligación (con el vector, el gen o banda que se quiere incorporar, y la ligasa) e incubar 1 hora a temperatura ambiente:

<b>Producto</b>	<b>Cantidad/ reacción (v<sub>f</sub> = 10 µl)</b>
Buffer	5 µl
pGEM (vector)	1 µl
T4 ADN ligasa	1 µl
Producto de PCR	2 µl
H <sub>2</sub> O estéril	1 µl

- 2) Aplicar un pulso de centrifuga al tubo con la reacción y también a las células competentes para asegurarnos de recoger todo el contenido y mezclarlo bien.
- 3) Transferir 50-100 µl de células competentes al tubo de 1.5 ml donde se ha realizado la reacción de ligación.
- 4) Mezclar con cuidado e incubar 20 min en hielo.
- 5) Realizar un shock térmico: 45-50 s en el baño a 42°C.
- 6) Poner en hielo 2 min.
- 7) Incubar el contenido del tubo en 5 ml de LB un mínimo de 1,5 h a 37°C.

- 8) Sembrar en LB/Amp<sub>100</sub> (la ampicilina evita que se pierda el vector).
- 9) Incubar 18 horas a 37°C. Las colonias crecidas serán las que han incorporado el plásmido pGEM con el gen insertado. Para asegurarse se realizará una PCR con los cebadores específicos para el gen de interés.

En células electrocompetentes:

- 1) Realizar la reacción de ligación, tal y como se indica anteriormente.
- 2) A partir de un o/n, poner a crecer 50 ml de la cepa huésped en LB hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,3- 0,5.
- 3) Centrifugar el cultivo 10 min a 3500 rpm y descartar el sobrenadante, para quedarse con las células que han quedado en el fondo.
- 4) Resuspender el pellet en 1 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril fría. A partir de este paso, las células y el H<sub>2</sub>O se mantienen en hielo.
- 5) Hacer un pulso de centrifuga a las células, y descartar el sobrenadante. Volver a resuspender en 1 ml de H<sub>2</sub>O fría.
- 6) Repetir el paso anterior 4-8 veces, de manera que los lavados sucesivos eliminen las sales contenidas en el cultivo.
- 7) En el último lavado, resuspender en 200 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril fría.
- 8) Añadir la reacción de ligación (con el vector) a las células y electroporar.
- 9) Incubar en 5 ml de LB entre 2-3 h a 37°C.
- 10) Sembrar en placas de LB/Ampicilina<sub>100</sub> e incubar 18 h a 37°C.
- 11) Las colonias crecidas son las que han incorporado el pGEM con el fragmento insertado. Verificar por PCR con los cebadores del fragmento de interés.

**Transformación y clonaje de un gen o fragmento de ADN en un plásmido:**

- 1) Obtención del fragmento de ADN: realizar una reacción de restricción con enzimas (Fermentas) que corten a lado y lado del fragmento o gen a clonar e incubar a 37°C durante 2-3 h.

<b>Producto</b>	<b>Cantidad/ reacción</b>
H <sub>2</sub> O bd estéril	16 µl
10X Buffer	2 µl
ADN (0.5-1 µg/µl)	1 µl
Enzima restricción (10 u/ µl)	0.5- 2 µl

- 2) Purificación del fragmento con un Kit de purificación de geles (protocolo descrito más abajo).
- 3) Extracción del plásmido que se usará como vector mediante un kit de purificación de plásmido (tal y como se explica más abajo).
- 4) Una vez extraído el plásmido, linealizar mediante reacción de restricción usando la misma enzima que se ha usado para el fragmento de ADN (que cortará en la “*multiple cloning site region*”), de manera que se creen extremos cohesivos y se pueda producir una correcta ligación.
- 5) Purificación del plásmido con un Kit de producto de PCR, para inactivar y eliminar la enzima.
- 6) Realizar la reacción de ligación del fragmento y el plásmido, e incubar entre 5-15 min a T<sup>a</sup> ambiente.

Producto	Cantidad/ reacción
10X Fast-Link Ligation Buffer	1.5 µl
10 mM ATP	1.5 µl
Vector	1 µl
Fragmento ADN	6 µl
Ligasa Fast-Link™ DNA Ligation Kits, Ecogen	1 µl

- 7) Inactivar la ligasa 15 min a 70°C.
- 8) Se procede al clonaje, que puede ser en tanto en células químicamente competentes, como en electrocompetentes (siguiendo los correspondientes protocolos, descritos anteriormente).

**Purificación de plásmido** (Qiagen Plasmid Midi Purification Kit, Qiagen Inc., Valencia, USA):

- 1) Partiendo de 25 ml (100 ml) de un 18 horas de la cepa que nos interesa, centrifugar a 6000xg durante 15 min y eliminar el sobrenadante.
- 2) Resuspender el pellet en 4 ml (10 ml) de tampón P1.
- 3) Añadir 4 ml (10 ml) de tampón P2 y mezclar por inversión 4-6 veces y luego incubar 5 min a T<sup>a</sup> ambiente. Aparecerá un lisado viscoso.
- 4) Añadir 4 ml (10 ml) de tampón P3, mezclar por inversión 4-6 veces e incubar 15-20 min en hielo. El material precipitado contiene el ADN genómico, proteínas, SDS, restos celulares...

- 5) Centrifugar a 15000 rpm durante 45 min y guardar el sobrenadante.
- 6) Poner columna Qiagen-tip 100 y equilibrarla aplicando 4 ml (10 ml) de tampón QBT.
- 7) Añadir el sobrenadante que habíamos guardado en la columna y esperar a que baje por gravedad.
- 8) Limpiar la columna con 2x10 ml (2x30 ml) de tampón QC.
- 9) Eluir aplicando 5 ml (15 ml) de tampón QF.
- 10) Tirar la columna y quedarse con la elución. Añadir 3.5 ml (10.5 ml), que son 0,7 volúmenes de isopropanol al ADN eluído. Mezclar y dispensar en tubos de 1.5 ml.
- 11) Centrifugar a máximas revoluciones 30 min a 4°C.
- 12) Eliminar sobrenadante y limpiar el pellet añadiendo 300 µl de etanol al 70%.
- 13) Centrifugar a máximas revoluciones 10 min y descartar el sobrenadante.
- 14) Dejar secar el pellet y luego resuspender en 50 µl de H<sub>2</sub>O, TE, Tris-HCl 10 mM pH 8.5...

**Purificación de bandas de geles** (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen Inc., Valencia, USA):

- 1) Recortar el fragmento de gel donde se localiza la banda que queremos purificar, con ayuda de una lámpara de emisión de luz UV.
- 2) Pesar el fragmento y añadir 3 volúmenes de tampón QG por cada volumen de gel (100 mg gel ~ 100 µl).
- 3) Incubar a 50°C hasta que se disuelva el gel (15-20 min) y vortear.
- 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) Para la unión del ADN, aplicar la muestra en la columna y centrifugar 1 min a 13000 rpm. 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.
- 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 13000 rpm, 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 13000 rpm.

- 10) Descartar el sobrenadante y centrifugar la columna 1 min adicional para descartar el tampón residual.
- 11) Poner la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml, descartando el tubo anterior.
- 12) Para hacer la elución del ADN, añadir 30-50 µl de tampón EB en el centro de la membrana de la columna y centrifugar de nuevo 1 min, y entonces obtendremos el ADN purificado.

**Purificación de producto de PCR** (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen Inc., Valencia, USA):

Mezclar 5 volúmenes de tampón PB en 1 volumen de tubo de PCR y aplicar la muestra en la columna QIAquick. A partir de este punto, se sigue el mismo protocolo que para la purificación de bandas de geles (paso 6).

**Purificación de ADN bacteriano** (QIAamp® DNA Blood Mini kit, Qiagen Inc., Valencia, USA):

- 1) A partir de un o/n, centrifugar y concentrar la muestra hasta un volumen final de 200 µl.
- 2) Añadir 20 µl de proteinasa K (QIAGEN Protease) y 200 µl de tampón AL. Vortear hasta que la solución sea homogénea.
- 3) Incubar a 56°C durante 10 min y hacer un pulso de centrifuga 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 8000 rpm 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 8000 rpm. Volver a cambiar el tubo de 2 ml.
- 7) Añadir 500 µl de tampón AW2 y centrifugar 3 min a 14000 rpm.
- 8) Descartar el filtrado y centrifugar 1 min para eliminar los restos de tampón.
- 9) Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml y añadir 200 µl de tampón AE o H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.
- 10) Incubar 5 min a T<sup>a</sup> ambiente y centrifugar 1 min a 8000 rpm para obtener el ADN bacteriano.

### **Extracción de ADN fágico:**

El ADN fágico se extrajo de diferentes grupos de muestras: cultivos bacterianos, y muestras ambientales. Para preparar los diferentes tipos de muestras:

- a) Lisógenos bacterianos. El cultivo se incubó en LB hasta llegar a la fase exponencial (DO 0.3- 0.5). Se añadió mitomicina C a una concentración final de 0.5 µg/ml y se incubó o/n a 37°C con papel de plata, en agitación (180 rpm).
- b) Biosólidos ambientales. Se procesaron 5 g de muestra, diluyendo en PBS o Ringer (50 ml de volumen final).
- c) Aqua de río. Se procesaron 100 ml de muestra.
- d) Aqua residual. Se procesaron 50 ml de muestra tal como se explica a continuación.

Una vez preparados los diferentes tipos de muestras, se procedió a realizar el siguiente protocolo de extracción:

- 1) Para separar la fracción fágica de las células bacterianas y otras partículas, el cultivo se centrifugó 10 min a 3500 rpm a 4°C. El sobrenadante se filtró con filtros de 0.22 µm de baja adsorción proteica (Millipore).
- 2) Las muestras se concentraron en Amicons (Millipore) a 3500 rpm, el tiempo en función del tipo de muestra. El volumen final fue de 0.5-1 ml, dependiendo de la muestra.
- 3) Tratamiento con ADNasa: Se añadieron 40 µl de ADNasa (10 mg/ml) por ml de muestra y se incubó 1h a 37°C. Después del tratamiento se cogió una alícuota (unos 20 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).
- 4) Se añadieron 12 µl de proteínasa K (20 µg/ml) y 0.5 ml de tampón proteínasa K por ml de muestra. Incubación 1 h a 55°C.
- 5) Precipitación del ADN fágico. La muestra se mezcló en una proporción 1:1 vol/vol con fenol/cloroformo (1:1 vol/vol) en tubos de phase lock (5-Prime) y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min. Se añadió cloroformo (1:1 vol/vol) al sobrenadante (en los mismos tubos). Se centrifugó de nuevo a 13000rpm 5 min.
- 6) 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.
- 7) El ADN precipitado se recogió (en tubos de 1.5 ml) centrifugando 30 min a 13000 rpm a 4°C. Después se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 300 µl de etanol al 70%. Centrifugar 10 min a 13000 rpm.

- 8) 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 agua bidestilada.
- 9) El ADN fágico fue purificado.

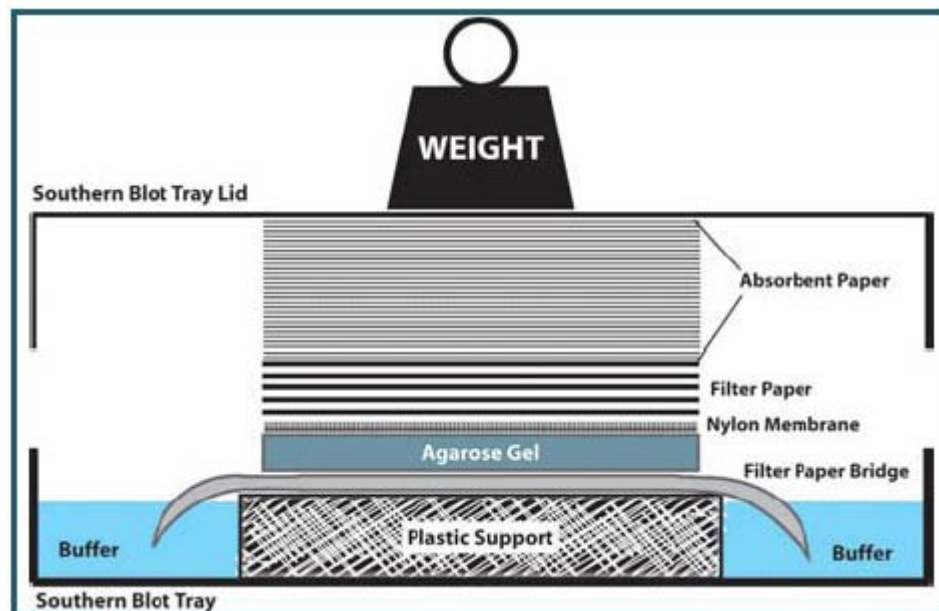
### **Análisis por RFLP y Southern-blot:**

Las enzimas elegidas para realizar el ensayo fueron *EcoRI*, *EcoRV* y *Clal*. Y se procedió de la manera siguiente:

- 1) Primero fue necesario obtener la muestra de ADN (proceso de extracción fágica, descrito anteriormente).
- 2) Reacción de restricción para un volumen final de 30 µl:
  - ADN a una concentración entre 0,5-1 µg/µl
  - 3 µl de tampón correspondiente al enzima.
  - 1,5 µl del enzima de restricción (*EcoRI*/ *EcoRV*/ *Clal*).
  - Hasta 30 µl de H<sub>2</sub>O bd estéril.
- 3) Para que el enzima actuase se incubó durante 2 h a 37°C sin agitación.
- 4) El producto de la restricción se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa del 0,8% (p/v), añadiendo a los 30 µl de la muestra 6 µl del tampón de carga (Dye buffer). Usar λ como marcador de peso molecular. La electroforesis se dejó durante 18 h a 25 V.
- 5) La visualización del ADN en el gel de agarosa se realizó con bromuro de etidio, dejando incubar el gel 10-15 min. Tras este tiempo se fotografió.
- 6) Antes de la transferencia Southern-blot, el gel fue tratado con tampón de desnaturalización durante 30 min en agitación.
- 7) A continuación se cambió el tampón y se realizó otro lavado de 5 min - 1 h con tampón de neutralización.
- 8) Entonces se procedió al montaje de la cubeta para la transferencia Southern por capilaridad:
  - a) Se dispuso de un cristal apoyado encima de la bandeja que fue cubierto con papel Whatman<sup>®</sup>, y se embebió con tampón SSC 10X.
  - b) Se cortaron tres trozos de papel Whatman<sup>®</sup>, del mismo tamaño que el gel y la membrana, donde se transferiría el ADN. Todo esto se embebió con el tampón SSC 10X.
  - c) Se situó la membrana de nylon encima del gel y se embebió con tampón SSC 10X.



- d) Encima de la membrana se colocaron otros tres papeles Whatman® embebidos en el mismo tampón.
- e) Para favorecer la transferencia del ADN por capilaridad se colocó una pila de papeles de filtro y se acabó de rellenar la cubeta con tampón SSC 10X. El montaje se incubó durante 18 h a Tª ambiente.



- 9) Una vez finalizada esta transferencia se dejó secar la membrana, se le aplicó el control positivo (amplímero de PCR) en una esquina (del mismo modo que en la hibridación colonial y de calvas de lisis) y se fijó el ADN con UV (2 min/cara). Después tuvo lugar la prehibridación y la hibridación con la sonda correspondiente, del mismo modo que en la hibridación colonial y de calvas de lisis.

### **Inducción de bacteriófagos y obtención de suspensiones fágicas:**

Para la obtención de la fracción fágica de un cultivo bacteriano, se siguió el protocolo descrito a continuación:

- 1) Se puso a crecer la cepa bacteriana en caldo LB a 37°C y en agitación a partir de un cultivo o/n, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> entre 0.3-0.5.
- 2) Para inducir el ciclo lítico de los profagos que contenía la cepa, se añadió mitomicina C a una concentración final de 0.5 µg/ml y se incubó a oscuras a 37°C en un agitador durante 18 h.

- 3) Al día siguiente se filtró el sobrenadante con filtros verdes de 0.22  $\mu\text{m}$  de baja adsorción proteica (Millipore) para separar la fracción fágica.
- 4) De esta manera, se obtuvo la suspensión de bacteriófagos.

#### **Experimentos de inducción con diferentes agentes inductores:**

- 1) A partir de un o/n, se puso a crecer la cepa que contenía los fagos en LB a 37°C y agitación hasta alcanzar la fase exponencial ( $\text{DO}_{600}$  de 0.3-0.5).
- 2) En este punto se hicieron alícuotas equivalentes en volumen del cultivo, para añadir a cada una un inductor: mitomicina C (a concentración final de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ), EDTA (20 mM pH=7.2) o ciprofloxacina (0.4, 1 y 4  $\mu\text{g/ml}$ ).
- 3) De la misma manera, se separó una alícuota sin inducir como control de la inducción.
- 4) Las alícuotas se incubaron 18 h a 37°C en agitación (la que contenía mitomicina C se incubó en oscuridad).
- 5) Al día siguiente se compararon los valores de  $\text{DO}_{600}$  y de número de fagos infecciosos entre los cultivos con los diferentes inductores y el cultivo sin inducir, para ver el efecto de estos diferentes agentes sobre la inducción del ciclo lítico de los fagos.

#### **Test de la gota y titulación de fagos:**

Este protocolo que se describe a continuación, el test de la gota, tiene como finalidad determinar si los fagos presentes en una muestra son infectivos o no:

- 1) Se puso a crecer la cepa huésped a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.3-0.5, para que esté en fase exponencial.
- 2) Se mezcló en un tubo 1ml de bacteria + 2.5 ml de LB semisólido (previamente fundido), se agitó con vórtex y se vertió en una placa de LB.
- 3) Se esperó hasta que el semisólido estuvo seco y entonces se puso una gota de 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión fágica sobre éste (obtenida según el protocolo de inducción).
- 4) Se esperó 10 min para que la gota se absorbiera y se incubó 18 horas a 37°C.

Para saber el título fágico de la muestra (ufc/ml), es decir, el número de fagos infectivos, el protocolo a seguir fue el mismo, con la diferencia de que en el paso 2 se añadió a la mezcla de bacteria y semisólido 1 ml de diferentes diluciones decimales seriadas de la

suspensión fágica, se vortexó y se incubó a 37°C 18 horas. Al día siguiente se hizo un recuento del número de calvas y se realizaron los cálculos pertinentes para la obtención de las ufc/ml de muestra.

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

### **Transducción de fagos y formación de lisógenos:**

Protocolo usado para la transducción de fagos Stx (variación del protocolo descrito en Muniesa *et al.*, 2004):

- 1) Un cultivo o/n de la cepa portadora del fago Stx fue diluido 1:100 en caldo LB y se incubó hasta la fase exponencial (D.O<sub>600</sub> 0.3 - 0.5).
- 2) Se añadió el agente inductor, la mitomicina C, a una concentración final de 0,5 µg/ml y se incubó toda la noche a 37°C en agitación (180 rpm) y en oscuridad.
- 3) Para separar la fracción fágica de los restos celulares, el cultivo se centrifugó 10 min a 3000 rpm a 4°C. El sobrenadante se filtró con filtros de 0,22 µm de baja adsorción proteica (Millipore). Esto permitió recuperar los fagos del cultivo, que se diluyeron de forma decimal y seriada en PBS.
- 4) La cepa huésped se puso a crecer en LB hasta alcanzar la fase exponencial. Se usaron cepas huésped stx negativas: *E. coli* 600, *E. coli* DH5α y *Shigella sonnei* 866.
- 5) Se mezcló 500 µl de las diluciones fágicas, 100 µl de CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) y 100 µl de la cepa huésped y se incubó 30 min en estático a 37°C.
- 6) La mezcla de fagos y bacteria se añadió a 3 ml de LB semisólido y se puso en placas de LB agar. Se incubó a 37°C o/n.

Protocolo usado para la transducción de fagos Cdt:

- 1) Se realizó el test de la gota con una suspensión de fagos Cdt (obtenida según el protocolo) y usando WG5 como cepa huésped, y se dejó incubando o/n a 37°C, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.
- 2) Al día siguiente se usó un asa de siembra para recuperar la zona del semisólido donde se encontraba el halo de inhibición con los bacteriófagos y se resuspendió en 500 µl de PBS.
- 3) Se realizaron diluciones decimales seriadas de la suspensión y se sembraron 100 µl de cada una en placas de LB agar.

- 4) Las placas se incubaron a 37°C o/n.
- 5) Al día siguiente, se realizó la hibridación colonial (según protocolo) con una sonda *cdt* específica de las placas que contenían un alto número de colonias pero suficientemente separadas como para distinguir una posible señal positiva. De esta manera, se pudo testar si alguna de las colonias obtenidas a partir del halo de inhibición del test de la gota habían sido capaces de incorporar el fago con el gen *cdt*.
- 6) Se recuperaron las colonias positivas de las placas y se comprobó por PCR que las colonias habían incorporado el gen.

\*De manera alternativa, si después del test de la gota se observó crecimiento de colonias en el halo de inhibición (que serían resistentes a la infección de los fagos y podrían haber incorporado el gen), se recuperaron estas colonias y se sembraron por estría en placas de LB agar. Después de una incubación o/n a 37°C, se comprobó por PCR si habían incorporado *cdt*.

**Transducción de fagos Stx que tienen incorporado un cassette de resistencia a antibiótico** (Serra-Moreno *et al.*, 2007):

- 1) Un cultivo o/n de la cepa portadora del fago Stx recombinante con el cassette de resistencia a antibiótico insertado (cloramfenicol o tetraciclina) se diluyó 1:100 en caldo LB y se incubó hasta la fase exponencial (D.O<sub>600</sub> 0.3 - 0.5).
- 2) Se añadió mitomicina C a una concentración final de 0,5 µg/ ml y el cultivo se incubó toda la noche a 37°C en oscuridad y agitación (180 rpm). Esto permitió la inducción de los fagos.
- 3) Al día siguiente se centrifugó el cultivo a 3000 rpm 10 min para separar la fracción fágica (en el sobrenadante) de las células. Se filtró el sobrenadante con filtros de 0,22 µm de baja adsorción proteica (Millipore), y se obtuvo así la suspensión fágica.
- 4) La cepa huésped se puso a crecer en LB hasta alcanzar la fase exponencial. Entonces 1 ml de la cepa huésped y 1 ml de la suspensión fágica obtenida anteriormente se incubaron en 5 ml de caldo LB, a 37°C y en agitación toda la noche.
- 5) Se realizaron diluciones decimales seriadas en PBS del cultivo o/n y se sembraron 100 µl en placas de LB suplementadas con el antibiótico apropiado (20 µg/ ml de cloramfenicol y 10 µg/ ml de tetraciclina), en función de la resistencia del fago.

- 6) Las colonias que crecieron (posibles transductantes que han incorporado el fago con el cassette de resistencia) fueron confirmadas por PCR.

### **Preparación de muestras para microscopía electrónica:**

Después de aislar una calva del fago y propagarla para incrementar su título, el sobrenadante con los fagos se recogió y se añadió cloroformo para eliminar los restos bacterianos. Se volvió a recuperar el sobrenadante y se filtró por filtros verdes PES de 0.22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente la muestra fue concentrada. Entonces se preparó para ser observada por microscopía electrónica siguiendo el protocolo de tinción descrito a continuación:

- 1) Se colocaron 5-10  $\mu\text{l}$  de la muestra sobre una rejilla de microscopía y se dejó durante 1 min para que ésta se absorbiera.
- 2) Se secó el exceso de muestra con un papel de filtro y se hicieron 3 lavados con agua en un tiempo total de 1 min.
- 3) Por último se hizo la tinción con molibdato amónico (1 min) y se secó el exceso con papel de filtro.

### **Protocolo de infección celular con toxina Cdt:**

Para observar el efecto citopático de la toxina Cdt sobre células Hela y CHO, se aplicó el siguiente protocolo de infección:

- 1) Primero, se obtuvieron los lisados fágicos. Para ello, se incubaron las cepas positivas para *cdt* a 37°C hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0.3-0.5 y se añadió mitomicina C (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Se incubó 18 h en un agitador a 37°C en oscuridad. Al día siguiente se filtraron las muestras con filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  para obtener la fracción fágica.
- 2) Después se procedió a la infección:
  - En placas de 6 pocillos, se quitó el medio viejo y se añadió 1 ml de los lisados fágicos en cada uno de los pocillos.
  - Se añadieron muestras de los filtrados con y sin mitomicina C, para comparar el efecto de la toxina producida por los fagos. También se añadieron controles negativos de PBS, LB y células solas.

- A continuación, se añadieron 2 ml de medio fresco y se dejó incubando en la estufa de CO<sub>2</sub>.
- Por último se observó el efecto citopático de la toxina sobre las células durante cinco días consecutivos.

### **Purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl** (Sambrook y Russell, 2001):

La purificación de fagos mediante gradientes de CsCl se usó para separar y purificar las diferentes fracciones fágicas de una suspensión de fagos de una muestra. Se siguió el protocolo descrito a continuación:

- 1) Se prepararon los stocks de los diferentes gradientes de densidad de CsCl:

Densidad	CsCl por muestra	H <sub>2</sub> O por muestra
<b>1.7g/ml</b>	1.124 g	0.875 ml
<b>1.5 g/ml</b>	0.908 g	1.09 ml
<b>1.3 g/ml</b>	0.624 g	1.375 ml

Una vez preparados los stocks, se esterilizaron por filtración con filtros azules de 0.22 µm.

- 2) Se añadió 0.5 g de CsCl a 1 ml de la suspensión de bacteriófagos y se disolvió por agitación.
- 3) En un tubo se añadieron 2 ml de sacarosa al 20%.
- 4) A continuación se procedió a hacer el gradiente con las tres soluciones de CsCl de diferente densidad (1.3 g/ml, 1.5 g/ml y 1.7 g/ml), añadiendo 1 ml de la de menor densidad en el fondo del tubo y, a continuación, ir añadiendo poco a poco las otras dos sucesivamente (con una pipeta Pasteur estéril para cada uno de los gradientes). Se marcó con una señal la interfase entre los gradientes.
- 5) Se añadió la suspensión de bacteriófagos sobre el gradiente de 1.3 g/ml.
- 6) Se centrifugó el tubo a 22000 rpm durante 2 horas a 4°C (ultracentrifuga Beckman, rotor SW41 de ángulo variable), realizando un correcto equilibrado de la centrífuga. Si hay que ajustar el volumen de alguno de los tubos, usar agua bidestilada estéril y tirarla muy lentamente para que se mantengan los gradientes.
- 7) Después de centrifugar, se recuperaron las bandas grises (correspondientes cada una a una fracción fágica de la muestra) pinchando con una aguja hipodérmica y dejándola gotear sobre un tubo de 1.5 ml.

### **Secuenciación masiva de ADN fágico:**

Para realizar la secuenciación completa del genoma del fago  $\Phi$ AA91-ss se realizó el siguiente protocolo:

- 1) Se obtuvo la suspensión fágica a partir de un cultivo o/n del lisógeno que contenía el fago, tal y como se ha descrito anteriormente. En el caso del fago Cdt, como es de inducción espontánea, no hizo falta utilizar ningún tipo de inductor del ciclo lítico.
- 2) Después de filtrar para obtener la suspensión de bacteriófagos, la muestra fue concentrada mediante concentradores de proteínas (Amicon Ultra centrifugal filter units, Millipore, Bedford, MA).
- 3) Posteriormente fueron purificados mediante gradientes de CsCl (según protocolo) para asegurarnos de obtener la fracción fágica correspondiente a los fagos Cdt.
- 4) La muestra de fagos fue entonces tratada con ADNasa y ARNasa a concentraciones finales de 0.3  $\mu$ g/ml para eliminar una posible contaminación de ADN o ARN bacteriano, e incubada a 37°C durante 1 h.
- 5) Después, el ADN fágico fue extraído por digestión con proteínasa K y precipitación con fenol:cloroformo, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.
- 6) La pureza e integridad del ADN fágico se comprobó con un NanoDrop (NanoDrop ND-1000 spectrophotometer NanoDrop Technologies, Thermochemicals, Wilmington, USA) y mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.
- 7) A continuación, se realizó la secuenciación del genoma usando una "Ion Torrent Personal Genome Machine" o PGM (Life Technologies):
  - Las librerías se generaron usando 0.5  $\mu$ g del ADN fágico y un kit "Ion Xpress Plus fragment library" según la guía de usuarios.
  - Tras la dilución de cada librería,  $4.5 \times 10^8$  moléculas fueron usadas para una amplificación clonal en partículas "Ion Sphere" durante la reacción de PCR según el manual "Ion Xpress Template 200 kit" (Life Technologies).
  - Estas amplificaciones se cargaron en un chip "Ion 316" y se secuenciaron usando 105 ciclos de secuenciación según la guía "Ion Sequencing 200 Kit". Cada ciclo secuenció, de media, 182 nucleótidos.
- 8) El ensamblaje de las secuencias se realizó usando el software "CLC Genomic Workbench" y los ORFs se identificaron con el programa de predicción de genes "GeneMark™" y el "ORF Finder".

- 9) Estos presuntos ORFs se determinaron por comparación con las bases de datos gracias al BLASTN del NCBI y el “European Bioinformatics Institute (UniProtKB/Swiss-Prot)”.
- 10) Finalmente, se usó el software MAUVE para comparar la secuencia completa del fago  $\Phi$ AA91-ss con otros fagos P2 y Cdt.

### **Inactivación natural en un mesocosmos:**

- 1) Para evaluar la inactivación natural de los fagos, se empezó por preparar las membranas de diálisis:
  - Se cortaron bolsas de diálisis (con guantes) de unos 15 cm y se dejaron los dos extremos abiertos.
  - Las bolsas se hirvieron durante 10 min en la solución o tampón de lavado.
  - Se lavaron con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.
  - Después se volvieron a hervir 10 min, esta vez en la solución EDTA.
  - Se dejaron enfriar (se pueden conservar a 4°C durante 1 mes).
- 2) Se prepararon las suspensiones de fagos tal y como se ha explicado anteriormente.
- 3) Se procedió al montaje:
  - Se lavaron las membranas con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril para eliminar los restos del tampón EDTA, y se hizo un nudo en uno de los extremos.
  - Se realizó una dilución 1:10 en agua del estanque (previamente filtrada) de cada una de las suspensiones fágicas y entonces los 10 ml finales de muestra se pusieron en las membranas de diálisis, que se cerraron por el otro extremo.  
\*Si hay más de un tipo de muestra, no hay que olvidar marcar las membranas, por ejemplo, con hilos de distintos colores.
  - También se hicieron membranas que contenían la cepa control de *E. coli*.
  - Una vez listas las membranas de diálisis (teniendo cuidado de mantenerlas siempre húmedas), se colocaron en una bolsa, que se introdujo en una jaula. Luego, ésta se colocó en el estanque, a unos 15-25 cm de profundidad.
- 4) En los tiempos establecidos, se recogieron las membranas y se procedió al análisis para ver la inactivación de las suspensiones fágicas y de la cepa control.



## Anexo 2. Composición medios de cultivo y tampones

### Medios de cultivo

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

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 1 l H<sub>2</sub>O destilada

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

#### **LB ss (semisólido):**

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 7 g Agar Bacteriológico Europeo
- 1 l H<sub>2</sub>O destilada

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

#### **LB agar:**

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 15 g Agar Bacteriológico Europeo
- 1l H<sub>2</sub>O destilada

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

Nota: Si el medio va suplementado con algún antibiótico, después de esterilizar en el autoclave se deja enfriar hasta unos 50°C y se añade el antibiótico a la concentración adecuada antes de plaquear.

#### **TSA (Trypticasein soy agar):**

- 40 g de TSA
- 1l H<sub>2</sub>O destilada

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

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

- 17 g caseína peptona
- 3 g peptona de soja
- 5 g cloruro sódico
- 2,5 g fosfato dipotásico
- 2,5 g dextrosa
- 1 l de H<sub>2</sub>O destilada

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

**Chromocult® (Merck):**

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

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

**Medio de crecimiento celular - MEM 5% SBF:**

- 9,39 g chromocult
- 900 ml H<sub>2</sub>O destilada

Disolver por agitación y esterilizar cubriendo el tapón de la botella con papel de aluminio a 121°C durante 20 minutos. El medio así preparado es estable a 4°C durante 30 días.

En la cabina de flujo laminar añadir:

NaHCO <sub>3</sub> al 7,5%	20 mL
Hepes buffer 1M	10 mL
L- glutamina 200 mM	10 mL
Penicilin/Streptomycin 10000 units.ml <sup>-1</sup>	10 mL
Suero Bovino Fetal	50 mL

El medio completamente preparado se guarda en la cámara de 30°C para detectar una contaminación en el caso que la haya y tiene una duración máxima de 15 días.

Soluciones y tampones

**PBS<sup>1</sup> (Phosphate buffered saline):**

- 8 g cloruro sódico
- 0,2 g cloruro de potasio
- 0,2 g hidrofosfato de potasio
- 1,15 g hidrofosfato de sodio heptahidratado
- 1 l H<sub>2</sub>O bd

Ajustar el pH a 7,1-7,2.

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

**Ringer ¼:**

- 2.5 g Ringer Powder, en polvo
- 1l H<sub>2</sub>O destilada

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

**Tampón SM:**

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

---

<sup>1</sup> PBS: Fosfato tamponado salino (“*phosphate buffered saline*”)

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

**Tampón de desnaturalización:**

- 20 g NaOH
  - 87,66 g NaCl
  - 1 l H<sub>2</sub>O bd
- No esterilizar, guardar a T<sup>a</sup> ambiente.

**Tampón de neutralización:**

- 87,66 g NaCl
  - 500 ml Tris HCl 1M pH 7,4
  - 500 ml H<sub>2</sub>O bd
- Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min y guardar a T<sup>a</sup> ambiente.

**Tampón 1 de hibridación:**

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

**Tampón 2 de hibridación:**

- 5 g agente bloqueante (Roche<sup>®</sup>)
  - 1 l tampón 1
- Disolver por agitación magnética o por calor (baño) y guardar a -20°C.

**Tampón 3 de hibridación:**

- 100 ml Tris HCl 1M pH 9,5
  - 100 ml NaCl 1M
  - 50 ml MgCl<sub>2</sub> 1M
  - 750 ml H<sub>2</sub>O bd
- Preparar inmediatamente antes de su uso, con soluciones estériles.

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

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

**Tampón de prehibridación:**

- 50 ml de SSC<sup>2</sup> 20X
  - 2 ml de N-lauryl sarcosina al 10%
  - 0,4 ml SDS<sup>3</sup> 10%
  - 2 g agente bloqueante (Roche<sup>®</sup>)
  - 145 ml H<sub>2</sub>O bd
- Guardar a -20°C.

**Tampón de hibridación:**

- 50 ml tampón de prehibridación
- 10 µl sonda marcada con dUTP (Roche<sup>®</sup>)

<sup>2</sup> SSC: Citrato sodio salino ("saline-Sodium Citrate")

<sup>3</sup> SDS: Sulfato sodio dodecil ("sodium dodecyl sulfate")

**SDS 10%:**

- 10 g SDS
- 100 ml H<sub>2</sub>O bd

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

**N-lauroyl-sarcosina 10%:**

- 10 g N-lauroyl-sarcosina
- 100 ml H<sub>2</sub>O bd

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

**Tampón SSC 20X:**

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

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

**Tampón SSC 10X:**

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

**Tampón SSC 2X:**

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

**2X SSC + 0.1% SDS:**

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

No esterilizar, guardar a T<sup>a</sup> ambiente.

**0.04X SSC + 0.1% SDS:**

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

No esterilizar, guardar a T<sup>a</sup> ambiente.

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

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

No esterilizar, guardar a T<sup>a</sup> ambiente.

**Tritón NaOH:**

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

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

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

- 3 g tween 20
  - 1 l de tampón 1 de hibridación
- Mezclar con agitación magnética y guardar a T<sup>a</sup> ambiente.

**Mitomicina C:**

- 0,5 mg de mitomicina C
  - 1 ml H<sub>2</sub>O bd estéril
- Una vez preparado, conservar a 4°C en oscuridad.

**ADNasa y ARNasa:**

- 10 mg de ADNasa o ARNasa
- 1 ml H<sub>2</sub>O bd estéril  
Una vez preparado, conservar a -20°C.

**Proteinasa K:**

- 20 mg proteinasa K
  - 1 ml H<sub>2</sub>O bd estéril
- Conservar a -20°C.

**Tampón proteinasa K:**

- 2 ml Tris HCl 1M pH 8
- 2 ml EDTA 0,5 M pH8
- 10 ml SDS 10%
- Hasta 100 ml de H<sub>2</sub>O bd

**Acetato sódico 3M:**

- 24,6 g de acetato sódico
  - 100 ml H<sub>2</sub>O bd
- Ajustar el pH a 4,5- 5,5 con HCl 37% y esterilizar en autoclave.

**Etanol 70%:**

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

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

- 109 g Tris Base
  - 55,6 g ácido bórico
  - 9,2 g EDTA
  - Hasta 1 de H<sub>2</sub>O bd
- Esterilizar a 121°C 15 min y guardar a T<sup>a</sup> ambiente.

**TBE 1X:**

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

**Gel de agarosa:**

- 150 ml TBE 1X
- Agarosa al 0.8%, 1%, 2% (p/v) o en el porcentaje adecuado en cada caso.

**Dye buffer o tampón de carga:**

- 40% solución de sacarosa
  - 0,25% azul de bromofenol
- Guardar a 4°C sin esterilizar.

**Bromuro de etidio para tinción de geles de ADN/ARN:**

Añadir 200 µl de la solución stock (1% en p/v) de bromuro de etidio (Merck®) a un litro de agua bidestilada.

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

- 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
  - 5 ml EDTA 0.2M (pH 8-8.5)
  - 995 ml H<sub>2</sub>O bd estéril
- Disolver por agitación. Preparar antes de usar.

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

- 5 ml EDTA 0.2M (pH 8-8.5)
  - 995 ml H<sub>2</sub>O bd estéril
- Disolver por agitación. Preparar antes de usar.

### Anexo 3. Cebadores usados en este estudio

PCR	Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño amplímero (pb)	Referencia
Multiplex CDT	CDT-up1 CDT-up2 CDT-lp1 CDT-lp2	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA	466	Tóth <i>et al.</i> , 2003
qPCR CDT	qcdtB-F qcdtB-R qcdt-probe	AGGCCGATGAAGTGTGGTTCTT CAATCCGTATGCCAAGCAATGG 6FAM-CCGCCACCTTGCCTT- MGBNFQ	69	Este estudio
CDT-I	CdtI-up CdtI-lp	CAATAGTCGCCACAGGA ATAATCAAGAACACCACCAC	411	Tóth <i>et al.</i> , 2003
CDT-II	CdtII-up CdtII-lp	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG TTTGTGTTGCCGCCGCTGGTGA	556	Tóth <i>et al.</i> , 2003
CDT-III	CdtIII-f CdtIII-r	AAACAGGACGGTAATAATGACTAATA GTGATCTCCTTCCATGAAAATATAGT	2230	Clark <i>et al.</i> , 2002
CDT-IV	CdtIV-up CdtIV-lp	CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC TTGCTCCAGAATCTATACCT	350	Tóth <i>et al.</i> , 2003
CDT-VA	c338f c2135r	AGCATTAAATAAAAGCACGA TACTTGCTGTGGTCTGCTAT	1329	Janka <i>et al.</i> , 2003
CDT-VB	c1309f c2166r	AGCACCCGCAGTATCTTTGA AGCCTCTTTATCGTCTGGA	1363	Janka <i>et al.</i> , 2003
CDT-VC	P105 c2767r	GTCAACGAACATTAGATTAT ATGGTCATGCTTTGTTATAT	748	Janka <i>et al.</i> , 2003
STX2	S2Aup S2Alp Stx369up Stx369lp	ATGAAGTGTATATTATTTA TTCTTCATGCTTAACTCCT GCGTTTTGACCATCTTCGT ACAGGAGCAGTTTCAGACAG	960 369	Muniesa <i>et al.</i> , 2004
qPCR STX	STX-Any F STX-Any R STX-Any M	ACGGACAGCAGTTATACCACTCT CTGATTTGCATTCCGGAACGT FAM-CCAGCGCTGCGACACG-NFQ	65	Imamovic <i>et al.</i> , 2010
Secuenciación fragmento Cdt	pBC-SK T7 pBC-SK SK WP-cdtA WP-cdtC WP P22	TAATACGACTCACTATAGGGC CGCTCTAGAAGTAGTGGATC GTCCTCCCTCTACTTGA GTGGATAATGATTCGAA ATTTGCGTAGTTCACGGT		Agilent Technologies Este estudio Este estudio Este estudio
CDT-1Φ integration site	P1 P2 B1 B2	CCATTACTCACCTTGTAC TGCTCTGAAAGTGACCG GAGTCCGATATTCTCGG TTCTTCAACGTGCGAACG	1108 1305	Asakura <i>et al.</i> , 2007
STX-Cm	rho-stx inversCm5	ATATCTGCGCCGGGTCTG AACAGTACTGCGATGAGTG	448	Este estudio
Integración (izq.) Fago Cdt-bacteria	attP1 attB1	ACAGCGATACATCGTGAAGC TCATCGGTGTTGGAGATATCA	654	Este estudio
Integración (der.) Fago Cdt-bacteria	attP2 attB2	GCAATATAATCGCACTGCAA GAGACAATGCATCGCCTTGT	585	Este estudio

Gen <i>cox</i>	Cox up Cox lp	ATGGAAGTCAATGACTATGT TCACAACCCCATCCACAAAAG	273	Este estudio
IS21- <i>cox</i>	IS21rev IS21fw	TGCACCGTTGCCCGGCAACC AGGCATCAGCGCGGTATGGA		Este estudio
IS21	IS21up IS21lp	GGTTGCCGGGCAACGGTGCA TCCATACCGCGCTGATGCCT	949	Este estudio
<i>stx</i> <sub>2</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub> -a <i>stx</i> <sub>2</sub> -b	GCGGTTTTATTTGCATTAGC TCCCGTCAACCTTCACTGTA	115	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>stx</i> <sub>2c</sub>	<i>stx</i> <sub>2c</sub> -a <i>stx</i> <sub>2c</sub> -b	GCGGTTTTATTTGCATTAGT AGTACTCTTTTCCGGCCACT	124	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>stx</i> <sub>2d</sub>	<i>stx</i> <sub>2d</sub> -a <i>stx</i> <sub>2d</sub> -b	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT CAGCAAATCCTGAACCTGACG	175	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>stx</i> <sub>2e</sub>	<i>stx</i> <sub>2e</sub> -a <i>stx</i> <sub>2e</sub> -b	ATGAAGTGTATATTGTTAAAGTGGA AGCCACATATAAATTATTTTCGT	303	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>stx</i> <sub>2g</sub>	<i>stx</i> <sub>2g</sub> -a <i>stx</i> <sub>2g</sub> -b	GTTATATTTCTGTGGATATC GAATAACCGCTACAGTA	572	Leung <i>et al.</i> , 2003

Cebadores diseñados en este estudio a partir de la secuencia completa del fago  $\Phi$ AA91ss y usados para confirmar la estructura genética del fago  $\Phi$ AA91. (a) forward primer (b) reverse primer.

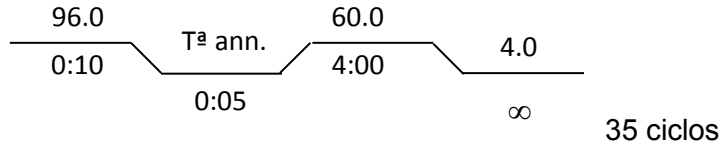
PCR	Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño amplímero (pb)
Fragmento 1	1a 1b	GCGGAGGCGGGGAAAGCACT CACTCCGCTGACATCCACCA	1259
Fragmento 2	2a 2b	CGGCGATCGAGTACCGGCA TGACCGGTGACCCGATTGTC	1230
Fragmento 3	3a 3b	CTCTGTGAGGCCATACCTGA CGTCAGGCAGGATGCCGC	1163
Fragmento 4	4a 4b	GTGTCATCAGTGCGCAGGAT TGGCGTTACGGACACGGAGC	1252
Fragmento 5	5a 5b	ATGCGACCAGATTAACCTTCG CACAGACTCACCGGCAGC	1204
Fragmento 6	6a 6b	CGCCGTACATGTTACCGA CAGCCACGGGCGCGGTCT	1169
Fragmento 7	7a 7b	TGCTGCCGCACGGCACC CCGGCAGCGACCAGCGAGAT	1196
Fragmento 8	8a 8b	GCGGGAGCTGCCGCCT CCATTGATATACAGCTCCATCGGTC	1194
Fragmento 9	9a 9b	TGCATGTGAAGAATATCCCG GTTTATGGGTGTGCAGTACCT	1204
Fragmento 10	10a 10b	CAACAGGCTGATTACCGGCA CGGCAGCAGCGGGATG	1214



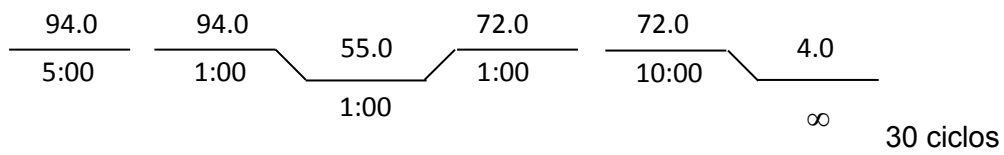
Fragmento 11	11a 11b	AGGACGTCAGGCCGGTG GGCAAGAGCTGGCTTATAACT	1203
Fragmento 12	12a 12b	ATCGCAGAGCTGGTTATTCC CCGTGTA AAAATGCAGCACCAT	1207
Fragmento 13	13a 13b	ACTGGGACAGTGGTGCTTAT TGACCAGAACTGTAGCGT	1203
Fragmento 14	14a 14b	CTGGAGCGCGCTGTCAGGC ATTCATCCTTGCAGGAATA	1190
Fragmento 15	15a 15b	ATATGACTGAGTTTTAACTCGCGG CACGCAGACCCAGCGCA	1213
Fragmento 16	16a 16b	AGCCTACCGCCAGAATTTAG CTCCAGCCGGTCGACGCC	1174
Fragmento 17	17a 17b	ATCTCCGTGGTCTGCACCTA GGGCATCAGCAACTTAACTC	1244
Fragmento 18	18a 18b	CGCAGTCAAACAGCGTTATCA CCCCATTGCGCCTGCTAC	1219
Fragmento 19	19a 19b	CTCATTGTCGGTAGCGCG GGTGAGTGACAGCGTAAAATCAAT	1205
Fragmento 20	20a 20b	GCCGTTGCTGGATGGTACCG CGACCGGTAGCCAGGCTGAT	1226
Fragmento 21	21a 21b	ATATGCCACGAAAGCGCAG CACAGATTACAAATTGCAGGGT	1216
Fragmento 22	22a 22b	ACTTCTCATAATCAACTTTGAATAA GGACTGGCTAACACACTCAA	1190
Fragmento 23	23a 23b	CGCCTGTGTTAAGCCTTCTG TGTCAGCCACATCGGCTATC	1212
Fragmento 24	24a 24b	GTTGAGCGGATGGTGAATA ACTCCAGCTTTACGTTTCTCTT	1222
Fragmento 25	25a 25b	AACAGCGATCCTGGATCGGCT CGAATCATGGCGTCAAGATGAGA	1242
Fragmento 26	26a 26b	GAAAGTCATGCATACAGTTTCTG AAGGCAGGCGGTTAATCGT	1200
Fragmento 27	27a 27b	ACGCGCCACGCGAGGC AGCGCATAGCGACGCATGAT	1180
Fragmento 28	28a 28b	GCGTGTTGTTGAACCACACC GCCGGGCATATAACAAAGCA	1191
Fragmento 29	29a 29b	TGATGAGTGGCCGGGGTTCA GGCATTCTGTCCGGGAGCT	1260
Fragmento 30	30a 30b	ACTTGCTGTGGTCTGCTATTTGT GTGCTTTCCCGCCTCG	1681

## Anexo 4. Programas de PCR

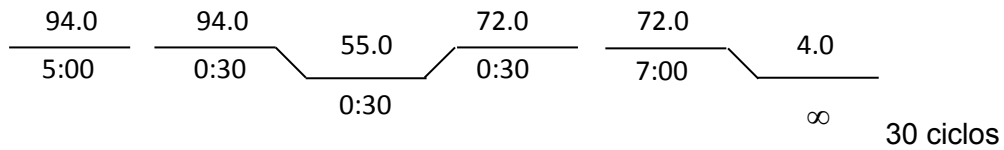
### Seq-pcr (secuenciaciones):



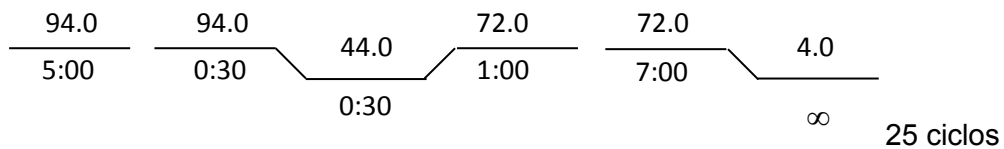
### Multiplex CDT:



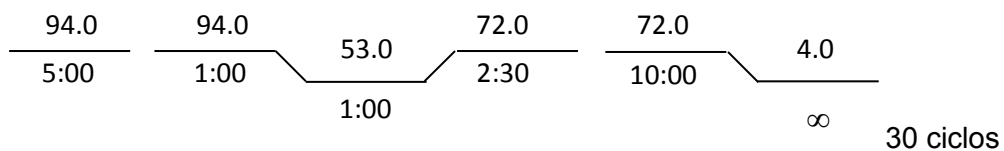
### STX2 (Stx369up/ Stx369lp):

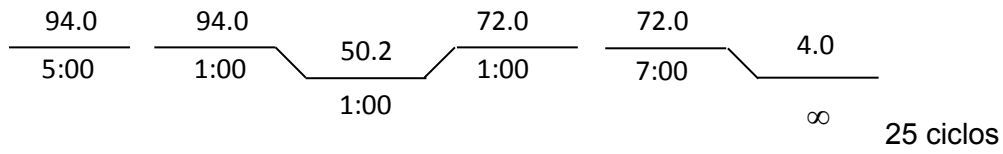
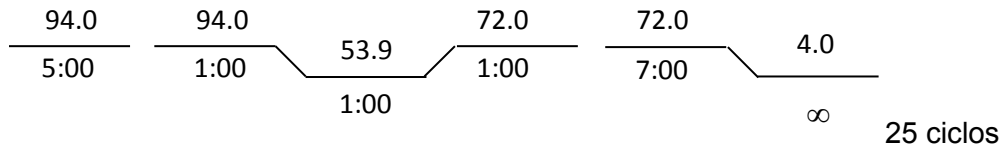
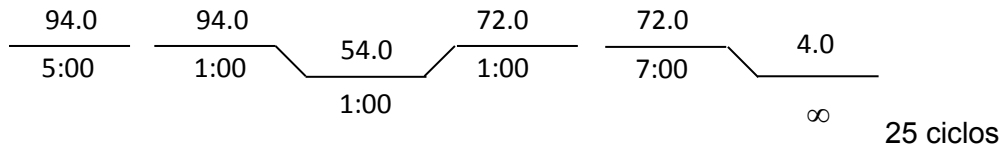
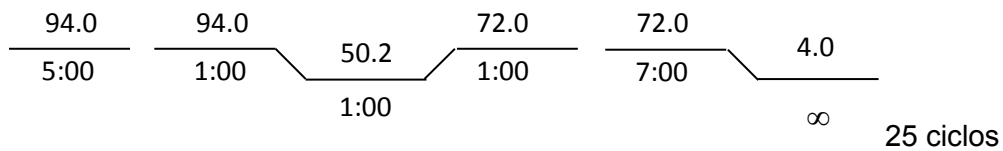
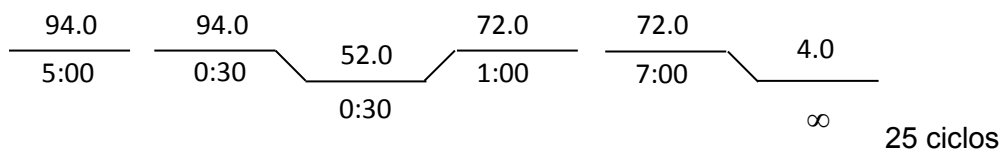
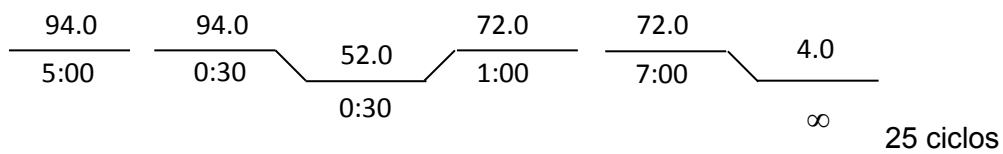


### STX2 (S2Aup/ S2Alp):

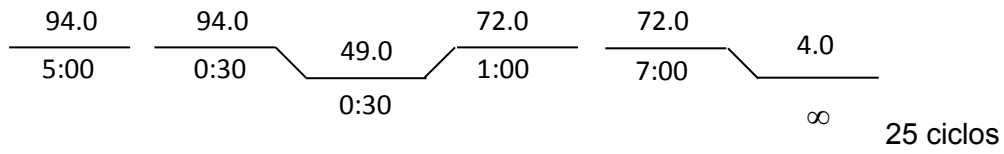


### pBC-SK / cdt (pBC-SK T7/ cdt lp1):

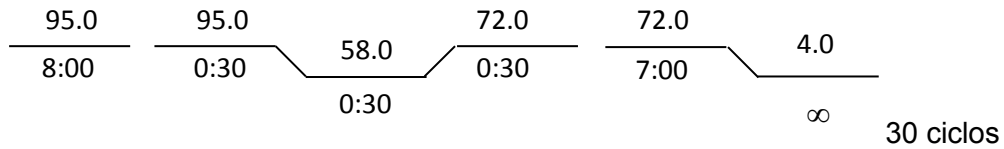


**Cdt-I:****Cdt-II:****Cdt-III:****Cdt-IV:****Cdt-VA:****Cdt-VB:**

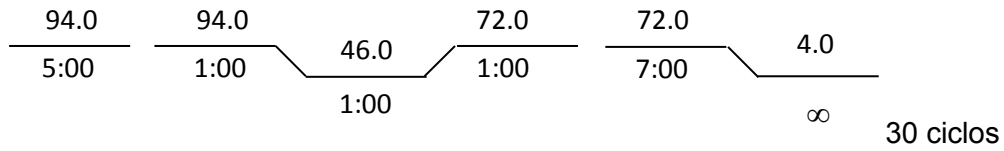
**Cdt-VC:**



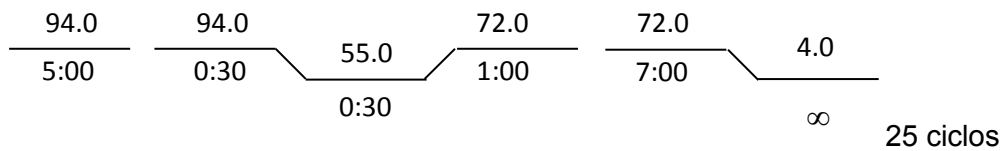
**Stx2, stx2c, stx2d, stx2e:**



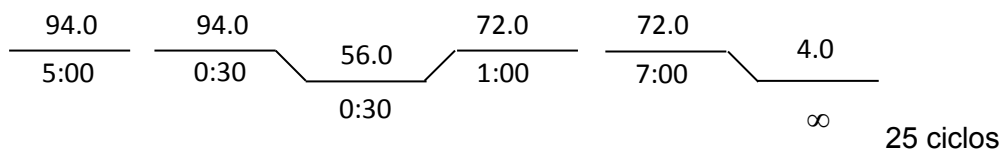
**Stx2g:**



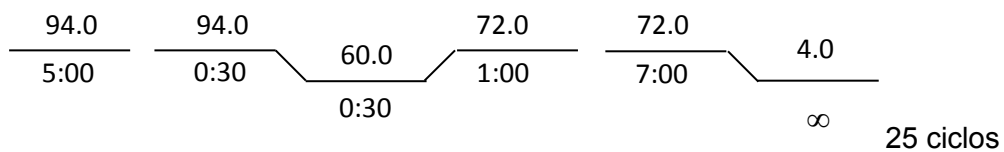
**Lugares de inserción fago CDT-1Φ:**

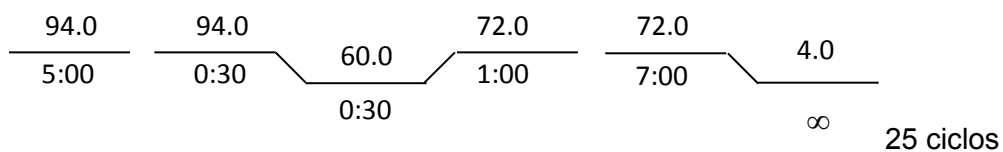
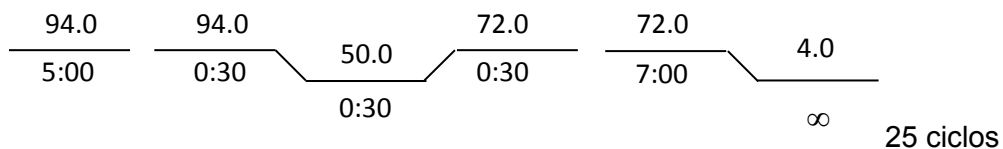
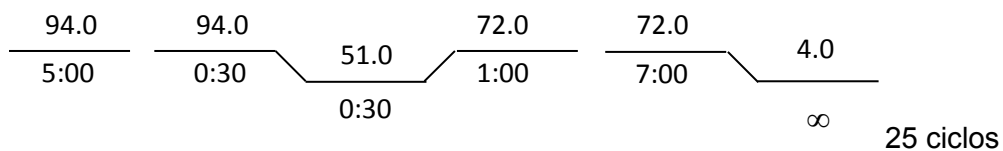
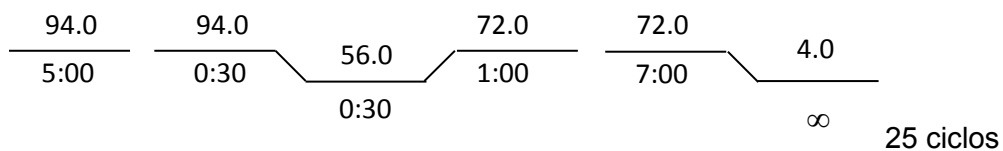
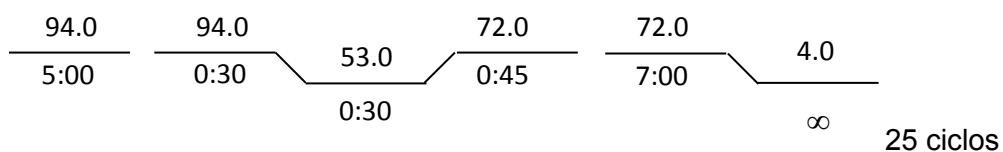
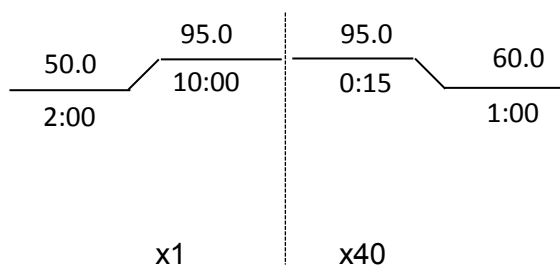


**Lugar izquierdo de integración fago Cdt-bacteria:**



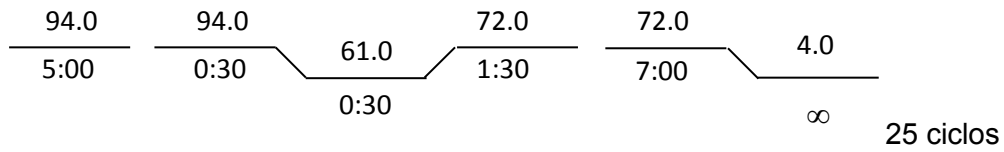
**Lugar derecho de integración fago Cdt-bacteria:**



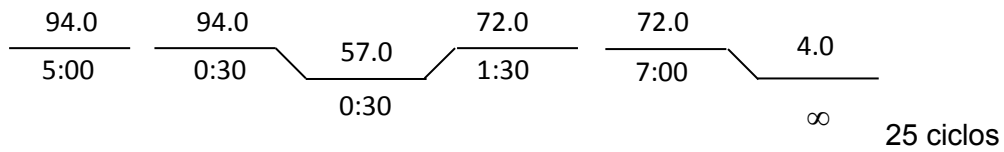
**IS21:****Gen cox:****Unión izquierda IS21-cox (Cox-up/ IS21-rev):****Unión derecha IS21-cox (Cox-lp/ IS21-fw):****STX-Cm:****qPCR CDT y STX:**

**PCRs secuencia completa fago  $\Phi$ AA91-ss:**

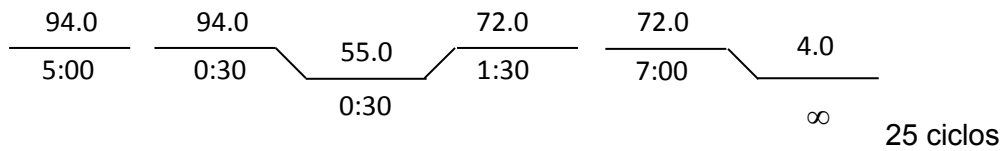
Fragmentos 1,2,7,8,20,29:



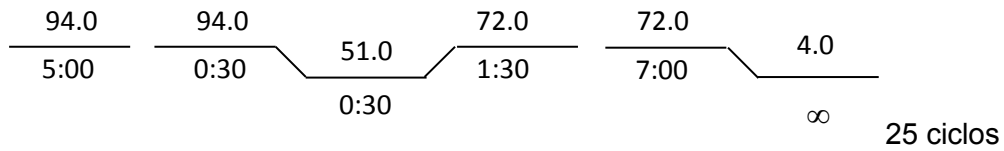
Fragmentos 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 25, 27, 28, 30:



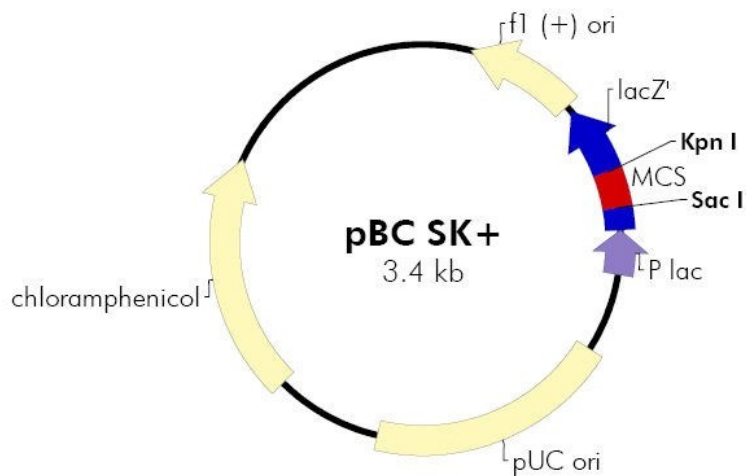
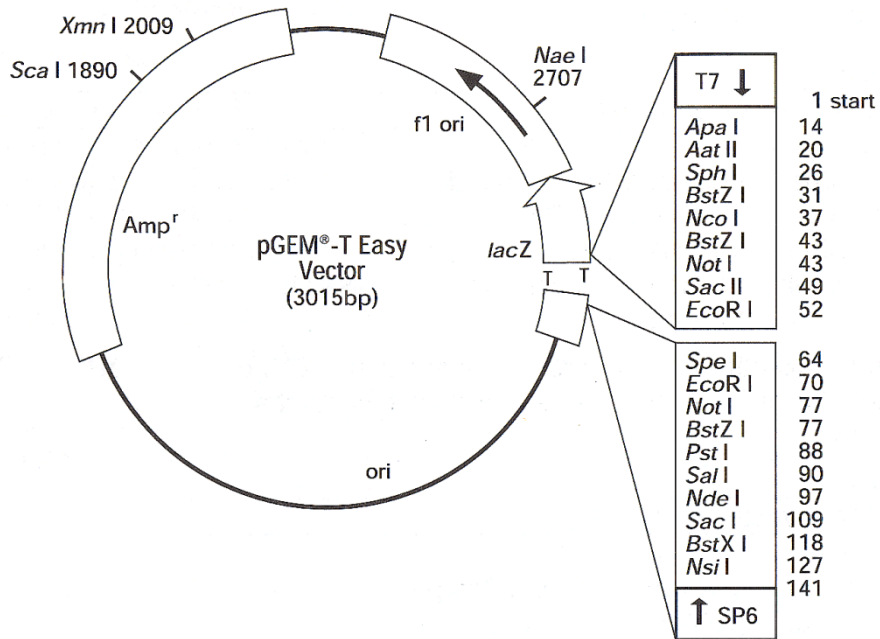
Fragmentos 5, 9, 21, 24, 26:



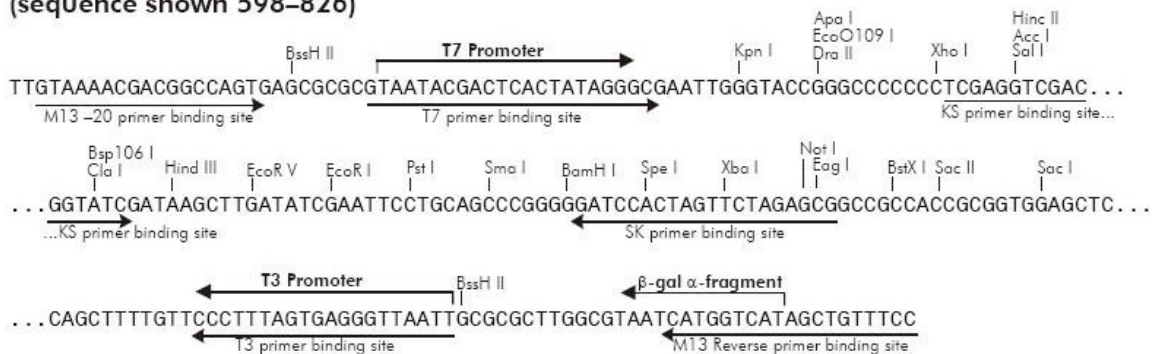
Fragmentos 14, 22:



## Anexo 5. Plásmidos usados en el estudio



### pBC SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



## Anexo 6. Secuencia completa del fago $\Phi$ AA91-ss

**GGCGAGGCGGGGAAAGCACT**GCGCGCTGGCGGTGGTGCTGATTTTATTTTTTCAGCGTCTGAGCGCGTCTG  
TGATGGCGTTTAGATTGTTTCGCCGGGGCGTTGGTGTGATGCGGGCTGTTTTGTGCGGTGGTGAGCGTGT  
GAGGGCGTGATGGCGGGTTGAAAAAGCCGCCCGCAGGCGGCGATGTTTCAGCCGTTGTCAGTGTCCAGT  
GAGTAGTTTTTAAAGCGGATGACCTCCTGACCGAGCCAGCCGTTTATCTCGCGGATCCTGTCTGTAAACGG  
GATAAGCTCATTGCGGACAAAGACCTTTGCCACTTTCTCAATATCTCCAGTGACCCGACGTTCTCCGGCTT  
GCCGCCATCAACTGAAAGGGGATGCGGTGTGCGTCCAGCAGGTCAGCGGCGCTGGCTTTTTTGATATTA  
AAAAATCGTCTTCGTCGCCACTTACTGAGCGGGATAATTTAATGCCGTGCGCTTTCCCTGCGGGGCA  
TAGAGAAACAGATTTTTAAAGTTGTTGCGGCCTTCGACTTCACCATGTTTTCGCGGAGCATTTTCGATATCG  
TTGCGATCCTGCACGGCATCGGTGACGTACATGATGTATCCGGCATGTGCGCCGTTTTCGTAATACTTGCG  
GCGGAACAGCGTGCGCGACTCATTAGCCAGGCAGAGTTAAGGGCGCTGAGATATTCCGGCAGGCCGTAC  
AGCTCCTGATTAATATCCGGCTCCAGCAGGTGAAACACGGAGCCGGGCGTGAAAGGTGTTGGCTCGTTGA  
AGGACGGCACCCACCAGTAAATATCTTCTCCACACCACGGCGGGTATATTTTCCGGTGAGTTTTCCAGT  
CTGATGACCTTACCGGTGGTGCTGTAACGCTTTTCCAGAAACGCATTACCGAACACCAGAAAATCCAGCAC  
AAAGCGGCTGAAATCCTGCTGGGAAAGCCACGGATGCGGGATAAATGTGAGGCCAGAATATTACGTTTG  
ACGTAATCGGGGAGCTGTGATGCACGGCAGCACGCAGGCTTTTTGCCAGACCGGTAAAGCTGACCGGTG  
GCTCATACCATCTGCCGTTACTGATGCACTCGACGTAATCCAGAATGTCA**CGGCGATCGAGTACCGGCACC**  
GGCTACCAAAGGTGAATGCCTCATTTCGGGGCGCTGGCGGTCATTGTTTTGCCGCTGGTCGCGGTGT  
TTCCCTTTTTTCTTGTCTCAGTAAACTCCAGAA**TGGTGGATGTCAGCGGAGTG**CTGATACCGGCGGTG  
AGTGGCTCATTTAACAGGGCGTGATGGTCGCCAGGCGAGGTGCGCGTGGCTGGCTTCTCGCTGCGGC  
TGGCCTCATAGGTGGCGCTGCGTCCGCTGCTGGTCATGGTCTTTCGGATAGCCATAAACGAGCTGGTGAT  
GTCGGTGGCGCTGACGTCATTTCCAGACAGCCACGGCGGATAACGTCTTTTGCCTTGAGCACCATTGCGG  
TTTTCATTTCCGGCGTGTAGCGGATATCGCGCGCGGCGGGATAGAACGAGCGCACGAGCTGGAACACACC  
GACACCGAGGCCGGTGGCATCAATCCCGATGTATTTCGACGTTGTATTTTTCGGTGAGTTTGCGGATGGATT  
CTGCCTGGGTGGCAAAGTCCATGCCTTTCCACTGGTGACGTTCAAGGATCCTGAATTTGCCACCGGCCACC  
ACCGGCGGTGCCAGCACCACGCATCCGGCGCTGTGCCACGGTGTGACGGTGTGTAACCAATCCATACCG  
GGCGGGAGCCGAACGGATTTGCGGCAAACGGCGCATAGTCTTCCATTCTTCCAGCGTGTGACCATAACA  
GCGTTGCAGCTCCTCGAACGGGAACACCGACGCCTTGTGTCACAAATTCACACATGAACAGGTTTTTAA  
AATCGTCGCGCTGTTTTCGCGTTTGAGCTGTCAATGTGCAACAGCGTGCAGCCGCCTTTCAGGGCGTCC  
TCAATGGTGACAATCTGCCGCACTGGCCGTCGCGACAGAGAAGCCACCGGCAAGGGCGTTATGACTGA  
CGTCGATTTCCACGCGTTCGGCGGCGCTGGCGCGTCCCCGTTGAACAGTTCACCCGACCAGAACGGGTA  
GGCGTCGTGCGCCAGCGTGGACGGGGTGGAGAAATAGGTCGATCGCAGGTGA**CTCTGTGAGGCCATACC**  
**TGAT**GCCACCTTACGCAGTACCTGAAAATTCGGGATCCAGAAAATCTCATCGACGTACAGGTGCGCCGTTAT  
GGCTCTGTGCGGTGTTGGAGTTGGTGCCGAGAAAATCAGTTTTGCACCGTTATTGCCAG**GACAATCGG**  
**GTCACCGGTCA**GGTCAACGTCAACCAGCCGGCAAAGGCGATGATGTATTTCGCGGAACACATACGCCTGC  
GTTTTACTGGCCGACAGAAAATCTGGTTATGACCGGTTTTTCAGGGCGCGCAGCAGCGCCTCGCGGGAAA  
AATAAACGTCGCGCAATCTGGCGGGATTTCAGAATATCGCGGATGCGGTGCTCAAGCCGGCGCGGATA  
CCAGTGCAACTGATATTGAAAGACTGCTCAAAGAAAATCTGCTCCAGCTTTTCGATGGCCTCGTCACTGAA  
AAAATCTTTTTCGGTTTGCAGCAGCCCGCCTTTGTTGCGGTTAGCGACGTTTCGGATTAAGGTCTGCCTCGTT  
GCCGGTCTGACTGTAGCGGTTTACCCGTGCCAGTCGTTCAATCTGGCGTCCGAGCAGGTCAATTTCTTGA  
AGTCACCGCCGTTTTCTGCGGTTTGATGATGAGCTGGGTGAGCCGCGCTTCCAGACTCATTTGACACGG  
CTGATGGGGGCAACGCTGTCCAGCCGTCGCGCTGTTTCCAGCTCTGCACCGTCGGGCGTTTTCATCTGCAA  
CATGGCGGCAATCTGCGGCACGGAAAACCCCTGCCAGTACAGCAGCGCCGCTGACGACGCGGGTCTGTT



AAAAGAGTGGTGTCTGTGGTGATGGTCATGAATACCTCGCCGTGATGAATACACGGCAAGGCTACTGAGT  
CGCGCCCCGCGATTTCGTAAGGTGCTGTTGTGTCACTGATAAGCCATCCGGGACTGATGGCGGAGGATGC  
GCATCGTCGGGAACTGATGCCGACATGTGACTCCTCTAATCACTATTCAGGACTCCTGACAATGGCAAAA  
AAAGTCTCAAATTCTTTTCGTATCGGCGTTGAGGGTGACACCTGTGACGGGC**GTGTTCATCAGTGCGCAGGA**  
**T**ATTCAGGAAATGGCCGAAACCTTTGACCCGCGAGTCTATGGTTGCCGATTAACCTGGAACATCT**GCGCG**  
**GCATCCTGCCTGACG**GTATTTTAAAGCGTTATGGCGATGTGGTCGAACTGAAGGCCGAAAAGATTGACGAT  
GATTCGGCGCTGAAAGGCCAAATGGGCGCTGTTTTCGAAAATCACCCGACCGATGACCTTATCGCGATGA  
ACAAGGCCGCGCAGAAGGTCTATACCTCAATGGAATTCAGCCGAACTTTGCCAATACCGCAAATGTTAT  
CTGGTGGGTCTGGCCGTACCGATGACCCGGCAAGCCTCGGCACGGAATACCTGGAATTCTGCCGCACGG  
CAAAACACAACCCTCTGAACCGCTTCAAATTAAGCCCTGAAAACCTGATTTTCAGTGGCAACGCCTGTTGAGC  
TGGAATTTGAAGACCTGCCTGAAACCGTGTTCACCCGCCCTGACCGAAAAGGTGAAATCCATTTTTGGCCGC  
AAACAGGCCAGCGATGACGCCCGTCTGAATGACGTGCATGAAGCGGTGACCGCTGTTGCTGAACATGTGC  
AGGAAAACTGAGCGCCACTGAGCAGCGCCTCGCTGAGGTGGAAACCGCCTTTTCCGCACTTAAGCAGGA  
GGTACTGACAGGGCGGATGAAACCAGCCAGGCATTCACCCGCCTGAAAAACAGTCTCGACCACACCGAA  
AGTCTGACCCAGCAGCGCCGAGCAAGGCCACCGCGGTGGCGGTGACGCCCTGATGACGAACTGCTGAC  
CGGCGTCAGTCAGTCCGGAAAAACCTTCAGGATTAACCCCTAATTTTCAGGAAAACTATGCGCCAGGAAAC  
CCGCTTTAAATTTAATGCCTACCTGTCCCGTGTTCGCGAACTGAACGGCATCGACGCCGGTGATGTGTCGA  
AAAAATTCACCGTTGAACCGTCGGTCACCCAGACCCTGATGAACACCATGCAGGAGTCTCTGATTTTCTGA  
CCCGCATCAACATTGTGCCGGTCAGCGAAATGAAAGGGGAAAAAATTGGTATTGGTGTACCCGGCTCCATC  
GCCAGCACAGCGACACCGCCGGTGGCACCGAGCGTCAGCCGAAGGACTTCTCGAAGCTGGCGTCAAACA  
AGTACGAATGCGACCAGATTAACCTCGATTTTATATCCGCTACAAAACGCTTGACCTGTGGGCGCGTTATC  
AGGATTTCAA**GCTCCGTGTCCGTAACGCCA**TTATCAAACGCCAGTCCCTTGATTTAATCATGGCCGTTTTA  
ACGGCGTGAGGCGTGCCGAAACCTCTGACCCGAGCAGTAATCCGATGCTACAGGATGTGGCGGTCCGGCTG  
GCTGCAGAAATACCGCAATGAAGCACCGGCGCGGTGATGAGCAAGGTCACTGACGAGGAAGGGCACAC  
CACCTCTGAGGTTATCCGCGTGGGTAAGGGCGGTGATTATGCCAGCCTTGACGCACTGGTGATGGATGCG  
ACCAACAACCTGATTGAGCCGTGGTATCAGGAAGACCCTGACCTTGTTGTTGATTGTGGGGCGTCAGTACT  
GGCGGACAAGTATTTCCCATCGTTAACAAGGAGCAGGACAACAGCGAGATGCTGGCCGCTGACGTCATC  
ATCAGCCAGAAACGCATCGGTAACCTGCCGGCGGTACGCGTCCCGTACTTCCCGGCGGATGCGATGCTCAT  
CACGAAGCTGGAAAACCTGTCCATCTACTACATGGATGACAGCCATCGCCGCGTGATTGAGGAAAACCCG  
AAACTCGACCGCGTGAGAACTACGAGTCAATGAACATTGATTACGTGGTGGAAAGACTACGCCGCCGGTT  
GTCTGGTGGAAAAAATTAAGGTCGGTGATTTCTCCACACCGGCTAAGGCGACCGCAGAGCCGGGAGCGTA  
ACCGATGACGAGTCCCGCACAGCGCCACATGATGCGGGTCTCGGCAGCGATGACCCGCGCAGCGGGAAGC  
CGCCCCGCTGCGACATGCAACTGTCTATGAGCAGATGCTGGTCAAGCTCGCCGAGACCAGCGCACACTGA  
AAGCGATTTATCAAAGAGCTGAAGGCCGAAAAAACCGGAACTGCTGCCGTTCTGGTTGCCGTGGGT  
GAACGGCGTACTGGAGCAGGGCAAAGGTGCACAGGATGACATTCTGATGACAGTCATGCTGTGGCGTCTG  
GATACCGCGATATTGCCGGTGCCTGGAGATTGCCGTTATGCCCTGAAGTACGGTCTGACCATGCCGG  
GTAAACACCGCCGACCC**CGCCGTACATGTTACCCGA**GGAGGTGGCGCTCGCGGCCATGCGCGCC**ACGC**  
**TGCCGGTGAGTCTGTGGATCCCCGCCTGCTGACGGACACCCTCGAACTGACCGCCACGGCTGACATGCCTG**  
**ATGAAGTGC**CGCAAAGCTGCATAAAATCACCGGTCTGTTTCTGCGTGACGGTGGTGATGCCGCCAGTGC  
GCTGGCGCACCTGCAACGTGCGACACAGCTCGACTGTCAGGCCGGCGTCAAAAAAGAGATTGAACGGCTG  
GAGCGGGAGCTGAAACCGAAGCCGGAGCCGAGCCCAAAGCGGCCACCCGTGTCCCGCGTAAGACCCGG  
AGCGTGACACCGGCAAAACGTGGACGCCGAAAAAGAAAGCCAGTTAACAACCGAATGCGCCCCGCGCC  
AGGGCGGCACGCCGTCAAGTGAAGGTGAATCACCTGACACTGCACCGCGTCCACCGCCGACTTTTCAG  
AGGTAGTCATGATGACGCTGATTATCCGCGAAAGGAGGCTCCTGTATCCGGTGAGGGTACGGTGGTTCAT  
CCCGCAACCGGCAGGCGACGAGCCGGTATTAAAAACACGTTCTTTTTCCCGATATCGACCCGAAGCGCG

TCCGGGAACGTATGCGCCTTGAGCAGACCGTCGCCCCGCCGTCTGCGTGAGGCCATCAAGTCAGGCAT  
GGCGGAGACGAATGCGGAGCTGTACGAGTACCGGAACAGAAAATTGCCCGGTTTTACACGTCTGGCG  
GACGTCCCGGCGGACGACATCGACGGTAAAGCATCAAAGTTTTTACTACGAGCGCGCCGTGTGTGCGA  
TGCGGACCGCGTCACTTTATGAACGTTATCGCGGTGTGGATGCCAGTGCAGAAAGGCGACAAGAAGGCCGA  
CAGCATTGACAGCACCATTGATGAGCTGTGGCGGGATATGCGCTGGGCAGTGGCGCGCATCCAGGACAA  
GCCGCGCTGCATCGTGAGTCAAATCTGATGAAGACCTTTGCGCTACAGGGCGACACGCTCGACGCCATCTG  
TGTCGGGTATTACGGGCGCACTGAGGGCGTGTGCGAGGCCGTGCTCGCCGCAAATCCGGGACTGGCTGAA  
CTGGGTGCGGTGCTGCCGCACGGCACCGCCGTCGAACTGCCGACGTTTCAGACCGCGCCCGTGGCTGAAA  
CTGTCAATCTGTGGGAGTAACGCATGACAGCAGAAGAAAAAGCGTCTGTGCTTTTTCATGATTGGGGT  
GCTGATTGTTGTCGGCAAGGTGCTTGCCGGTGGTGAACCCATCACCCGCGTCTGTTTATCGGGCGCATGT  
TGCTCGGTGGTTTTGTCTCGATGGTTGCCGGTGTGTTCTGGTGCAGTTTCTGACCTGTCACTGCCTGCGG  
TGTGCGGTATCGGCTCCATGCTGGGTATCGCCGGTTATCAGGTGATTGAGATTGCCATTACAGCGCCGCTTT  
AAGGGCAGGGGGAAACAGTAATGCCGGTAATTAACACGCATCAGAATATCGCCGCCTTTCTCGACATGCT  
GGCCGTGTCCGAAGGGACGGCAAACCATCCGCTGACGAAAAACCGGGGCTATGACGTGATAGTACCAGG  
ACTGGACGGGAAGCCGGAATTTTACCGACTACAGTGACCACCCGTTCCGACATGGCCGACCGGCGAAG  
GTGTTTAAACCGTCGCGGTGAAAAATCCACGGCCTCCGGTCGCTATCAGCAGCTTTACCTGTTCTGGCCGCAT  
TACCGCAAACAGCTTGCCCTGCCGGATTTAGTCCGTTGTACAGGACAGACTTGCCATTAGTTGATCCGC  
GAACCGGTGCACTGGATGACATCCGGGCGGGACGCATTGAGCGCGCCATTTACGCTGTGCAATATCT  
GGGCGTCCCTGCCGGGTGCCGGTTACGGTCAGCGTGAGCATTACTGAAAAACTGGTACCCTGTGGCG  
TACCGCTGGCGCGTACCGGCTTAAACGGAGTAAACACCATGAAGAAATTATCCCTTTACTGATGCTGAA  
CGTGTGCTGGCGCTGATGCTGGCACTGTCCCTGATTTACCCGAGAGCGTGGCCGTCAATTTTGTGCCA  
CCTGGGCGATTCTGGCGACGGTTATCTGTGTGGTTGCCGGTGGTGTGCGCGTGTATGCCACTGAGTATGTG  
CTGGAACGCTACGGCGGGAGCTGCCGCCTGATCGCTGGCCGTGAAGATTGTACGTCGCTGTTTTTGCA  
GCCGGTGCCGTGGCGCAGACGGGCGGCGCTCTGGTGGTGTGTTGGCGACGTTTATCTCGCTGGTGGCT  
GCCGGGTGGATTTTTACCGCGCTGATTTACCTCGTGGCGTGGTGTCTTCCGGCTGATACGTACGGCCTGT  
CGTCAGCGTTTTGAGGGGCGGGAACCATGTCAAAGCTGATGATTGTGATGGTTGTGTTGTTATCGCTGGCG  
GTGGCGGGGCTGTTTCTGGCGAAGCATGAAAACGCCAGCCTGCGCGCCTCGCTGGACAGGGTGAACAAC  
GTCGCCAGTGAACAGCAGACGACCATACCATGCTGAAAAATCAGCTTCATGTTGCCCTACCAGGGCAGA  
CAAAAACGAGCTGGCGCAGGTGGCACTGCGTCAGGAACTGGAGAACCGCCGGAAGCGTGAAGCACAGCG  
CGAGAAAACCATCACGAGGTTACTTAATGAAAACGAAGATTTTCGCCGCTGGTATGGTGTGACCTGCCTG  
ATGCTGTGCGCCGTTGCACCAGCGCCCCGCTGCACTGACGCCAGTGATTGTCCACAACGCCTGCCCGAA  
AGTGAGCCTTTGCCGATGCCGGGACGTGACCCGAGAAAGACGGCGATTTAAGTGCCGATATCCGGCAG  
CTTGAGAACGCGCTGGCACGTTGTGCCAGCCAGGTAAAAATGATTAACACTGTGAGGACGAAAATGATG  
CTCAAACCCGACAGCCTGCGCAGGGCGCTGACTGATGCCGTACGGTGTGAAAATAACCCGAGATGC  
TGCGGATATTCGTGGATAACGGGAGTATTGCCTCCACTGGCGACGTCTATGTCATTGAAAAGCGTTAC  
ACGCTCAATGTGATTGTGACCGACTTTACCGGTGATTTTACCTGCTCATTGTGCCGGTGTGGCGTGGCTG  
CGGGAAAATCAGCCCACATCATGACCACCGACGAAGGCCAGAAAAAGGGCTTACGTTTTATGCAGACA  
TCAACAATGACAGCAGCTTTGATATCAGCATCAGCCTGATGCTGACCGAGCGCACGCTGGTCACTGAGGTT  
GACGGCGCGCTGCATGTGAAGAATATCCCGAACCTTCGCCCGCGGAGCCGTTACCCGACCGATGGAGC  
TGTATATCAATGGCGAACTGGTGAAGTGGGATGAATGAGTTAAGCGTTTTGAAGACCGGCTGACCG  
GACTGATTGAATCGCTGTACCGTCAGGGCGTGGCGACTGAGTGCCGAACTGGCGAAGCGTGTGCGGCA  
GAGTCAGCAGCGTCGGGTGATGGCACAGAAAGCCCCGACGGCACACCCTACGCGCCACGCCAGCAGCA  
GAGCGCCAGAAAAAGACCGGTGCGGTTAAGCGAAAAATGTTTGCGAACTTATACCAGTCGCTTTTTGC  
ATATCCGCGCCAGCCCAGGACATCAATGGAGTTTTACGGCGGGAAAGTACCAGAAAATCGCCAGTGT  
GCATCAGTTCGGTCTGTGCGAAGAAACCCGAAAGACGGTAAGAAAATTGATTATCCGGCGCGTCTCTG

CTCGGCTTTACCGGTGAGGATGTGCAGATGATTGAAGAGATTATTCTGGCTCACCTCGACCGTTAGTTGTG  
CCATTCTGACACCTCATCGTCACATTGCCCGGATGACCCGGCGGCATCCTTCCCGTTATGAACACTCT  
CGCAAATATTCAGGAACCTCGCGCGCGCACTGCGCAACATGATCCGCACCGGCATTATCGTCGAAACCGACC  
TTAACGCCGGTCTGCTGCCGTGTGCAGACCGGCGGCATGTGCACCGACTGGCTTCAGTGGCTGACTCATCGC  
GCCGGTCTTTCGCGCACATGGTGGGCACCTTCTGTGGGGGAGCAGGTGCTGATTCTGGCCGTGGGCGGTG  
AACTCGACACGGCGTTCTGTTCTGCCGGGATTATTCCGGCGATAACCCCGCGCCGTCTGCGTCGGCGGAT  
GCCCTGCATATCCGTTTCCCTGACGGGGCGGTGATTGAGTATGAACCTGAAACCAGCGCACTCACGGTAAG  
CGGAATAAAACAGCCAGCGTGACGGCTTCTGATTCTGTTACTGCCACGGTGCCGGTGGTTCATGGTAAAA  
GCATCAACCCGCGTCACCCTGGACACACCGGAGGTGGTCTGCACCAACAGGCTGATTACCGGCACGCTGG  
AAGTGCAGAAGGGCGGGACGATGCGCGCAACATTGAACACACCGGCGGTGAACTCTCATCAAACGGTA  
AGGTAAGTGCACACCCATAAACACCCCGGCGACAGCGGCGGCACAACCGGGAGTCTCTATGACAGCGCGT  
TATCTCGGAATGAATCGCAGTGTGGCTGACGGTCACTGACCTCGAGCATATCAGCCAGAGTATCGGCGA  
TATCCTGCGCACACCGGTCCGGTACGGGTGATGCGTCGTGATTACGGCTCGTTGCTGGCGTCAATGATTG  
ACCAGCCGACAGACCCCGGCGCTTGAGTTGCAGATTAAGTTCGCTGTTACATGGCGGTGCTGAAATGGGA  
ACCCCGCGTACCCTGTCATCCGTCACTAGCGCAGTTTTGACGGACGAATGACGGTACGTTAACCG  
GCCAGACAACGACACCGGCCAGCCACTTTCGTTAACCATCCCTGTGAGTTGAAACCATGCCGATTATCGA  
CCTGAACCAGCTACCCGCACCGGATGTGGTTGAGGAGCTGGACTTTGAAACCATTCTCGCTGAACGCAAGG  
CGACTGATTTCCCTTACCCGGAAGACCAGCAGGAGGCGGTGCCCCGTACCCTGACGCTGGAATCTGAG  
CCTCTCGTCAAACGCTGGAGGAAAATGCTTATCGTGAGCTTATCTGGCGTCAGCGTGTGAATGAGGCTGC  
ACGGGCGGTGATGCTGGCCTGTGCAGCCGTAATGACCTTGATGTGATTGGTGCCAATTACAACACCACG  
CGCTGACTATACCCCGCAGATGATTGACCACTCCGCCGACACCGGCAGTGTGGAGTCTGACACCGA  
TTATCGTCTGCGTATTCAGCAGGCGTTTGGGGCTTAAGCGTCGCCGGTCCGGTGGTGCCTATCAGTATC  
ATGGTTCGAGTGCCGACGGCGTGTGCGGATATCTGTCAACAGTCCGTCTCCGGCCTGCGTCAACATC  
TCTGTGCTGTACGTGAAAATAACGGTGTGCGATCCGAAGACCTGCTGGCGGTGGTGCCTAACGCCCTTAA  
TGGCGAGGACGTCAGGCGGTGGCCGACCGCGTGACCGTGCAGTCTGCCGCATCGTTGAATACCAGATA  
AACGCCACGCTTACCTTACCTGGTCCCGAAAGCGAACCCATCCGCGCTGCTGCCGTGAAAAAACTGGA  
AGCGTACATCACAGCACAGCACCGGCTGGGGCGCGACATCCGTCTGTCTGCCATTTATGCTGCTTTGCATG  
TGGAAGGCGTGACGCGTGTGAACTGGCCGACCACTGGCCGACATCGTACTCAACAGTACGCAGGCGTC  
TTTCTGTACCGAATACCGCGTGTGACCGGAGGCTCGGATGAGTATTGCGCCTGCTGCCGACCGGCTCA  
TCACCGCTTGAAGTCGCCGCCGCAAAAGCCTGTGCGGAAATTGAAAAACGCCGGTCACTTTCGTGAGCT  
GTGGAACCCGATACTGTCCGGCAAATCTGCTGCCGTGGCTGGCGTGGGCGTTTTTCGGTCGACAGGTGG  
GATGAAAAGTGGCCGGAAGCGACAAAACGCGCGTTATCCGCGATGCCTATTTTCATCCACTGTCATAAAGG  
CACTATCGGCGCAATCCGGCGTGTGGTGGAGCCGCTCGGCTATCTCATCAACGTGACGGAGTGGTGGGAA  
AACAGTGACCCGCCGCGACCTTCCGGCTCGATATTGGTGTACTGGAAAGTGGCATCACAGAGGCAATGT  
ATCAGGAAATGGAACGGCTGATTGCTGATGCCAAACCTGCAAGCCGCCACCTTATTGGCTGAACATTACC  
CGGGACATCCCGGCTACCTGTTCCGGTGGTGTGGCTTACGACGGCGATGTAATTACGGTTTACCCCGG  
ATAAGTGAGGAATAATGAGCACAAAATCAAACCGTTATCACCCTGCCGGTGCAGCAAAGCTGGCAGC  
GGCAACCGCACCGGGAGGGCGGAAGGTCAATATTACCACGATGGCCGTCCGGGATGGCGGTGGTAAATT  
GCCTGTCCCGGATGCCGGACAGACCGGACTTATCCATGAAGTCTGGCGACATGCGCTGAACAAAATCAGC  
CAGGACAAACGAAACAGTAATTATATTATCGCAGAGCTGGTTATCCGCCGGAGGTGGGCGGTTTTCTGGA  
TGCGTGAGCTTGGCCTGTACGATGATGCGGGAACATTAATTGCCGTGGCGAACATGGCCGAAAGTTATAA  
GCCAGCTCTTGCCGAAGGCTCAGGGCGTTTCGACAGCTGTCGATGGTCATCATCGTCAGCAGTGTGGCCT  
CAGTGGAGCTGACCATTGACACCACAACAGTGTGGCGACGCAGGATTACGTTGATGACAAAATTGCAGA  
GCACGAACAGTACGACGTACCCGGACGCCTCGCTGACCGCAAAGGTTTTACTAGTTAAGCAGTGCGA  
CCAACAGCACGTCTGAAACACTGGCCGCAACGCCGAAAGCGGTAAAGGCCGCGTATGACCTTGCTAACGG

GAAATATACCGCACAGGACGCCACCACCGCGCGAAAAGGCCTTGCCAGCTAAGTAGCGTCACCAACAGC  
GATTCTGAAACGCTTGCGGCAACGCCAAAGGCGGTTAAGACAGCGTATGACCTTGCTAACGGGAAATACA  
CTGCACAGGATGCCACCACAGCGCGAAAAGGTCTTGCCAGCTCAGTAGCGCCACCAACAGCGATTCTGAA  
ACGCTTGCGGCAACACCAAAGCGGTGAAGTCTGCCTATGACAATGCTGAAAAACGTCTTCAGAAAAGATC  
AGAACGGTGC GGATATTCCGGGAAAGGATACTTTCACGAAAAATATCGGTGCCTGTCGTGCTTATAGCGG  
CGCTTTGAGCACTGAAGCCGAAACTGGACAACCGCTCAGTTTATTGACTGGCTAGAGTCTCAGGGAGCCT  
TTAATCATCCCTACTGGATGTGCAAGTGTTCCTGGTCATACGGTAATAACAAAATTATTACCGATACTGACT  
GTGGGACGATTCATCTTGCAGTTGCGTGATTGAGTTATGGGCGTTAAAGCTGCAATGACCATTTCGTGTG  
ACCACTCCGAGTACATCAAGCGGTGGCGGTACCACCAGTGCGCAATTTACGTATATCAATCACGGAGCTGA  
TTATGCGCCGGGCTGGCGACGCGACTACAATACGAAAAATAAGCAACCGGCTTTTGCATTAGGGAAAACA  
GGAAATACGGTTGCAATAATAAAGCGGTAGGATGGAACCTGGGACAGTGGTGCTTATTGTGCACAGGATG  
GCGGAGCATCAAAAATGGTGCTGCATTTTACACGGGTGAGGGAAAGTTGTCCGGCAATGCAGTTTCTTGTG  
GATTATAAAAACAGGGGGATTTTTACAGGTCGGCACGTGATGGGTATGGATTTGAGGCTGACTGGTCAG  
AGTTTTATACAACATCACGAAAGCCAACACCTGCGGATATTCTTGCTCTGGCATTATCAGGCGGAAGCATGT  
CAGGCAGCATAAAAATTTATCAATGATGCCTCCTGATTTGGGAAAGAAACACTGACTGGGCGAAAATTGGA  
TTTAAAAATGATTCAGATGCTGATTCTGACTCATACATGTGGTTTGAAACTGGTGATAATGGCAATGAATAT  
TTTAAATGGCGCATCAGGTCTGGCAGCACAACAAAAGACCTGATGACGCTTAAGTCTGATGACTACGGGT  
TACCGGGCAGGTGATACCATCAAATTTAGCAATTTTACTCCCGCTATGTCCGGGATATCCGGCTTGGTG  
GTGCCGCCACATACAACTGCGAACAATGGCATGACATGGACACATCAGGCACCGTCCGGGTGTGTATAT  
ACCGGCATTATTGTTTCCAGGATACCGGCTCAAACCTGCGGATAACATTGGTGCGTATATTACAGACCGGT  
TCAGAAATACATTAACGGGACATGGTACAACGTGGCGCAGGTATAATTTATGCAGCATTGATAAATATAA  
CGGTGGTAATCCAAAACAGTTGAACAATATCAATTGACAAAGGACTTTGATGTCGTCTGGTTTTTTACA  
GAAGATGGTAAGAAGTGGTACGAAGAACAAGTATTTGCTGATGACACGATAAAAATAGCGTACGACA  
AAGATAATATCATCCGCTATGTGGAAAAGGATGTGACAGCTATCAGACCGGATGGATTAAGTGTGGTTGA  
AGTGCGGATATTACTGCTAATCGACGGGCGGACATTTAGGGGGCTGGATGTTAAGGACGGCAAAGTG  
ATTAACGCATTTATACGGCAGAGGAATTGCAGAAGCAGGCAGAAAATCGGAAAGCCAGACTTCTTGCAG  
ATGCTGAATCCGTGATTTTGCCTGGAGCGCGCTGTGAGGCTGAATATGGCAACAGAGGAGGAGCGCAC  
ACGGCTGGAGATCTGGGAACGCTACAGTGTCTGGTCAAGTCGTGTAGAACCAGCAAATCCTGAATGGCCG  
GAAATACCGCAATAAATTGTATAAGCTCTGATGTGAGTTTATACATCTATGGCACAGAGTAAAACTAATCT  
GACAGTTTCGCTCTGTGCCAAAAGCAGAATTTACCCATTACGATTATACACCATGTAAAAACGGTTGTTTCT  
TCGTGCTCTCCCTCGCTGCTAACTTCATTAATAAATCCTCTGCTAACATCATCAGAAATATCAATAATGTGT  
TTAACGCAGAAAAGGGTCTTAAATTGCTTGTGCTGTTAAGGCTGACTTATCAATCGCTAATTGCTCGCTATT  
ACATCTTTAAGTAAGAAAATACTTACCCAAAAGCCTGCGATAACATCAGATAGTTGGACAGCCTCTGA  
GTTGTGGGATTTAACGAATTCATGATTCTGTATTGGTATGCCATTTTTCAGTTAACGGGAAGTTTTTAACTTCA  
TCTTGAATGCTATTTTCTTCATCAAATATGTGAATGGAATTTTTAAATAGATAACAAGTTTCTTAAATAAATA  
CCATAAAGCTATCGATCAGTTTTCGACCATGAAATCCCGATATGAACGGTAGTTCTTCGATTTTTAGAGATT  
CTTTAACCAAATTTTGTGAGTGCCTGTGCTCGAAAATCTGGTAGCATACACTGTGCATGCATGAAAATCGA  
TAAGCCAGAGGCAAAGTCATAAACTTTTTCTTCTGGAATATCGGGGTAGTTAAATTTATGTAGAGCATTCA  
GGAAAACATCGGAATTGCTATTGGCAAGCTCATAAAAATCGCTCTTAAGTGACATGTGGTTCATGATATAA  
AAAGGATTATGTAGCTCTCAAATAATAGAATCAATAATGTCAATAATAGACCAATATGTGATATTAAGATTA  
AAATAATGGATGTGGAAATTGTTTTCAATAAGCCAGTTTAGAATAATTAAGCTTATCAGATTTAAGCATG  
TCCAAAACACTACCTTGGCAATATGACTGAGTTTTAACTCGCGGCACTTTTTTGAAGATTAAGCTTTTTA  
AATAGGGTTAAATAATCGCTGTGAGTCTTAACCCTTTGTGTAGTATTCCTGCAAGGATGAAATATCCGCC  
TTTACAACATTAACCAGAATCTTTTAAATATAGTTTTTGAATATTATTCGTTTCATCATAATAAACGTAT  
AGACTTCGTGAGTATTTTGAAGACCATTATACTTGATAAGTAACTCTAAGTTCAATGACATCCATTTTATT

CCCCTAATGCAATTCTCAAACCTAAGGTCAATTCAGTAATTATCATATAAAGTTAGCCTAACAAACATATTA  
TGAATGTCTGCTATTTCGCTCAAAGCAGACTGTCAGATTTGATAGCGTTTTGGCTATGTA AATTGTCAGTCGG  
AAAATGAGTGTGTACAAATCAGGACAGGCGGGCAGATTGCCCGCCTTTCTTTGTCTGTTGTTTCATCCACT  
GACCAGCCAGGTCAAATAGCGTCTCATGCTCTGCACAACAGAAAATACCACTACCCATTAACCACGGAGT  
TAAACGGATGAGTACTATCATCATGGCGTGCAGGTGCTGGAGATTAACGACGGCACCCGCGTCATTTCCA  
CCGTATCCACGGCCATTGTCGGCATGGTCTGCACGGCCAGCGATGCGGATGCGGAAACCTTCCCCCTCAAT  
AAACCGGTGCTGATTACCAATGTGCAGAGCGCAATTGCAAAGGCCGGTAAAACAGGCACGCTGGCGGCAT  
CGTTGCAGGCCATCGCTGACCAGTCAAACCGGTACCGTTGTCGTGCGTGTGGAAGACGGCACCCGGCGA  
AGACGAAGAAACGAAGCTCGCGCAGACCGTTTTCCAATATCATCGGCACCACCGACGAAAACGGTCAGTAC  
ACCGGACTGAAAGCCCTGCTGGCGGCGGAGTCGGTAACCGGTGTTAAACCGCGTATTCTCGGCGTGCCGG  
GACTGGATACCAAAGAGGTGGCTGTTGCACTGGCATCTGTCTGTGAGAAGTTGCGCGCTTTCGGGTATATC  
AGCGCATGGGGCTGTAAAACCATTTCCGAGGTGAAAGCCTACCGCCAGAAATTCAGCCAGCGTGAGCTGA  
TGGTATCTGGCCGATTTCCTCGCATGGGATACGGTCAGCAGCACCACCGCCACCGCGTATGCCACCGCC  
CGTGCCTGGGTCTGCGTGCCA AAATCGACCAGGAGCAGGGGTGGCATAAAACGCTGTCCAACGTCGGG  
GTGAACGGTGTACCAGCATCAGCGCCTCTGATTCTGGGATTTGCAGGAGTCCGGCACCGATGCTGACCT  
GTTGAACGAGTCAGGTGTCACAACGCTGATTGCGCGTGACGGTTTTCCGCTTCTGGGGTAACCGTACCTGCT  
CTGATGACCCGCTGTTCTCTTTGAAAACCTACACCCGACCGCGCAGGTGCTGGCCGACACGATGGCTGAG  
GCGCATGTGGGCGGTGGACAAGCCCATCACTGCAACGCTGATTGCGGACATCGTTGACGGCATCAATG  
CCAAATTCGTGAGCTGAAAACAAACGGCTATATCGTGGATGCGACCTGCTGGTTCAGCGAAGAATCCAAC  
GATGCGGAAACCTCAAGGCCGAAAACCTGTATATCGACTACGACTATACACCGGTGCCTCCTCTCGAAAA  
CCTGACCCTGCGCCAGCGTATTACCGATAAATACCTGGCAAATCTGGTCACCTCGGTTAACAGCAATTAAG  
GAGCCTGACCGATGGCAATGCCGCGCAAACCTCAAGTTAATGAACGCTTTTCTGAACGGCTACAGCTATCAG  
GGCGTTGCAAAGTCCGTACGCTGCCAAAACCTGACCCGTAAGCTCGAAAACCTATCGCGGTGCGGGGATGA  
ACGGCAGCGCACCGGTAGACCTCGGCCTTGATGACGATGCGTTGTCAATGGAGTGGTCGCTCGGGGGCTT  
CCCGGATTCGGTTATCTGGGAGCTTACGCCGCAACCGGCGTGGATGCCGTGCCGATTCTGTTTTGCAGGCT  
CTTACCAGCGGACGATACCGGCGAAAACGGTGGCCGTCGAAGTGGTCATGCGTGGCCGTCAGAAAGAAAT  
CGACACCGGTGAGGGTAAACAGGGAGAAGACACCGAGTCGAAAATCTCCGTGGTCTGCACCTATTCCGG  
CTGACGATGGACGGTAAGGAGCTGGTCGAAATTGACACCATCAACATGATTGAGAAGGTGAACCGGCTCG  
ACCGGCTGGAGCAACACCGCCGCAATATCGGCCTGTGATTTTCATCCGGTCAGCCAGGCTGACCGGTTAAC  
CCCGATTGAGAAGTGAGAAAACCATGAACAAAGAAAATGTGATTACCTGGACAATCCGGTCAGGCGTGG  
TGAGCAGGTTATCGAACAGGTACGCTGATGAAACCTAATGCCGGGACGCTGCGCGGTGTCAGTCTGGCT  
GCGGTGCGAAACTCCGAAGTCGATGCACTGATTAAGGTGCTGCCGCGCATGACGGCACCGATGCTGACCG  
AGCAGGAAGTCGCCGCGCTGGAACCTGCTGACCTTGTGGCGCTGGCCGTAAGGTGGTCGTTTTTTGTC  
GCCGAACTCGGTGCAGTGACGTTCCCGAAAACCTGTGCGTGCATGACCTGATGGCGGATGTGGCAGTGA  
TATTTCACTGGCCGCATCAGAACTGTATCCCATGAGCCTGACCGAACTCATCACATGGCGCGAAAAGGCG  
CTCCGGCGAAGCGGAAACACGAATGAGTAACAATGTAAAATTACAGGTATTGCTCAGGGCTGTTGACCAG  
GCATCCCGCCGTTTAAATCCATCCGCACAGCGAGCAAGTCGCTGTCGGGGGATATCCGGGACACACAAA  
AATCACTGCGGAGCTGAACGGTCACGCATCCCGTATTGAGGGATTCCGCAAGACCAGTGCACAGCTCGCC  
GTGACTGGTCATGCACTTGA AAGGCACGGCAGGAAGCCGAAGCCCTGCCACACAGTTTAAAAATACCG  
AACGTCGACCCGTGCTCAGGCGAAAAGTGTGGAATCCGCAAAGCGTGGCGGAGGACTTACAGGCGA  
AATATAACCGCCTGACGGATTCTGTTAAACGCCAGCAGCGGGAACCTGGCCGCTGTGGGAATTAATACCCGC  
AATCTTGACATGATGAGCAGGGGTGAAAACCGTATCAGTGAAACCACCGCACAGCTTAACCGTCAGC  
GTGACGCGCTGGCGCGTGTGAGTGCACAACAGGCAAAACTTAAACGAGTCAAACAGCGTTATCAAGCAGG  
AAAGGAACTGGCCGAAATATGACCTCAGTGGGCGTCCCGGTGTGGGGATTGCGGCGGCGGGAACGAT  
GGCCGGAGTTAAGTTGCTGATGCCCGGTTATGAGTTTGCAGAAAACCTCAGAATTGCAGGCCGTGCTC

GGAGTGGCAAAGACTCCGCCGAAATGACCGCACTACGCAAACAGGCGCGCCAGCTCGGCGACAATACC  
GCCGCTCGGCGGATGATGCGGCCGGTGCACAGATAATCATCGCGAAAGCGGGTGGGATGTTGATGCC  
ATTCAGGCGGCAACGCCGGTACGCTGAATATGGCGCTGGCGAACCGCCGCACGATGGAAGAAAACGCC  
GCCCTGCTGATGGGGATGAAATCCGCCCTTTCAGCTTTCAAACGATAAGGTCGCTCATATCGGGGATGTTCT  
CTCCATGACGATGAACAAAACCGCCGCCGATTTTGACGGCATGAGCGATGCGCTGACCTATGCCGCACCTG  
TGGCAAAAAATGCCGGTGTGAGCATTGAAGAAACCGCCGAATGGTCGGGGCACTGCATGATGCAAAAAAT  
TACCGGTTCAATGGCGGGGACGGGAAGCCGTGCCGTGTTAAGCCGCTGCAGGCACCGACGGGAAAAGC  
ATGGGATGCACTCAAAGAGCTTGGCGTGAACCTCAGACAGCAAGGGAACACCCGACCAGTATTTACC  
ATTCTGAAAGAAATGCAGGCCAGTTTTGAGAAAAACCGGCTCGGTAAGTCCAGCAGGCTGAATACATGA  
AAACTATTTTCGGGGAGGAGGCCAGCTCAGCCGAGCCGTGCTGATGACTGCCGCTCAACCGGAAAGCT  
GGACAACTGACCGCTGCGTTAAAGCCTCAGACGGGAAGACCGCAGAGCTGGTAAATATCATGCAGGAC  
AACCTCGGCGGTGACTTTAAGGAGTTTCAGTCCGCTTATGAGGCGGTGGGGACTGACCTGTTTGACCAGCA  
GGAAGGCGCACTGCGTAAGCTCACACAGACGGCCACAAAGTATGTGTTAAACTCGACGGCTGGATCCAG  
AAAAACAAATCACTGGCGTCAACCATCGGCCTCATTGTCGGTAGCGCGCTGGCGCTTACTGGCATCATCGG  
TGCAATTGGTCTTGTAGCCTGGCCGTTATCACCGCATCAATGCCATCATCGCGGTAGCAGGCGCAATGG  
GGCAATCTTACGACGGTTGGCAGTGCTGTTATGACGGCCATCGGGGCGATTAGCTGGCCGGTTGTGGC  
CGTGGTGGCCGCAATTGTCGCCGGGGCGTTGCTTATCCGTAAATACTGGGAGCCTGTCAGCGCATTCTTTG  
GCGGTGTGGTGAAGGGCTGAAAGCGGCATTTGCGCCGGTGGGGGAACTGTTACGCCACTTAAGCCGG  
TGTTTGACTGGCTGGGTGAAAAGTTACAGGCCGCGTGGCAGTGGTTTAAAACTGATTGCCCGGTTAA  
GCCACACAGGACACCCTGAACCGTTGCCGTGACACGGCGTCATGTTCCGGCAGGCACTGGCTGACGCGC  
TGATGCTGCCGCTTAATGCGTTCAACAACTGCGCAGCGGTATTGACTGGGTACTGGAAAACTCGGTGTT  
ATCAACAAAGAGTCAGACACACTTGACCAGACCGCCGACGAACTCATGCCGCCACGTATGGCACCGGTG  
GTTATATTCCGGCGACCAGCTCTTATGCAGGCTATCAGGCTTATCAGCCGGTACGGCACCGGCTGGCCGC  
TCTTATGTGGACCAGAGTAAAAACGAATATCACATCAGCCTGACGGGTGGTACTGCGCCGGTGACACAGCT  
CGACCGCCAGTTACAGGATGCGCTCGAAAAATACGAGCGGGATAAACGTGCGCGCGCCCGTGCCAGCATG  
ATGCATGACGGTTAAGAAGGTGACGAAAAATGATGCTCGCGTTAGGTATGTTTGTTTTATGCGCCAGACG  
CTGCCACACCAGACCATGCAGCGTGAATCAGATTATCGCTGGCCGTCAAATCCCCTATCGGCAAACGGGA  
GGCCTACCAGTTTCTCGGTGTTGGCGAGGAAAACATGACGCTTGGCCGGTGTGCTTTATCCCGAACTGACCG  
GCGGAAAGCTGACGATGACCACGCTCAGGCTGATGGCAGATGAAGGCCGGGCGTGCCGTTGCTGGATG  
GTACCGGCATGATTTACGGCATGTATGTCATCAGCAGGGTGAGTGAAACAGGGAGTATTTTCTTTCGACAG  
GGCACACCCCGAAAATTGATTTTACGCTGTCACTCACCAGCGTGGATGAATCACTGGCCGCGCTTTATGG  
CGATATCGGTAACAGGCGGAGTCGCTCATCGTAAGGCTGGCAGTATGGCGACCAGATTCACGGGAATG  
ACGGGGGCGGAATAATGCTGGATGCGCTGACATTTGATGCAGGCAGTACGCTGACGCCGATTACATGCT  
GATGCTCGACAGCAGGGATATTACCGGCAATATCAGTGACCGTCTGATGAGCATGACTCTGACGGATAACC  
GGGGCTTTGAGGCTGACCAGCTTGATATTGAACTGAACGATGCCGACGGGCAGGTTGGGCTGCCGTTTCG  
TGGCGCTGTCTGACGGTGTATATCGGCTGGAAAGGTTTTGCCCTGGTATGCAAAGGGAAATCACCGTTG  
ATGAGGTTGAACACCGGGGCGCGCCGGATGTGGTACCATCCGCGCCCGGAGTGCAGATTTTCGCGGGAC  
GCTCAATCCCAGCGTGAAGGCTCATGGCATGACACCAGCTCGGTGCGATTGTTGAGGCGATAGCCTCCC  
GTAACAGGCTGGAAGCCAGTGTGCTCCGTCCTGACTGGCCGGAATTAATAATCCCGCACATCGACCAGTCGCA  
GGAGTCTGATGCGAAATTTCTGACCCGCTTGCAGAACGTAACGGCGGCGAGGTGTCGGTAAAAATGGGA  
AAACTGCTGTTTCTCAAAGCGGGGAGGGGGTACGGCCAGTGGTAAAAAATCCCGCAGATTACCATCA  
CCCGCAGCGACGGCGACCGTCATATTTGCGATTGCTGACCGTGGAGCTTACACCGGCGTAACGGCAAA  
GTGGTTACACACCAAAGACCCGAAACCACAAAAGCAGAAGGTAATAACTGAAACGCAAAAAGAAAGAAA  
ACACCTGCGCGCACTGGAGCACCCGAAAGCAAACCGGTCACGCAGAAGAAAGCGCAAAAAGTACCGGA  
AGCGCGCAAGGTGAATACATGGCCGGTGAAGGCTGACAACGTTTTTGCCTGACTACGGTATATGCCACG

AAAGCGCAGGCCATGCGCGCCGCTCAGGCGAAGTGGGATAAACTGCAACGGGGTGTGGCGGAGTTCTCC  
**ATCAGCCTGGCTACCGGTCG**GGCAGATATTTACACGGAAACACCGGTTAAAGTGTGAGGCTTTAAGCGCGT  
CATAGACGAGCAGGACTGGACAATCACTAAGGTGACACATTTTCTGAATAATAGCGGCTTCACGACGTCCC  
TGGAGCTTGAGGTCAGGCTTTCTGATGTGGAGTACGAGACAGAAGATGATGAGTGATGTGTTTTATTTATC  
TGTTTGTTTTATAGGGATAAATTAACATAAAATGGCACCATCAACAAACCGGAAGAGGTGCTCGCGATGTTT  
CATTGTCTTTATGCCAGCATGCCGCACATGCGCGTACAAGCCGCTATATCACTGACACGACAAAAGAGCG  
TTATCACCAGTGCCAGAACGTGAATTGCAGCGCCACGTTCACTTATGAGTCGGTACAGCGATACATCG  
TGAAGCCGGGAGAAGTCCACGCCGTAAGGCCGACCCGTTGCCGTCAGGGCAGCAAATTATGTGGATGTG  
ATCACAAAATAGCCCTCAGTTGAGGGGCTTATTTATGGTCGATGTGGACGCTATGTGGACAGTGCTTGA  
TATAATCCATTTATATCATCAGGTTAGGTGCTTTTTGTGACACCATCCCTGTCTTCCCCACATGATGTGG  
GGTTTTTTTTATCAATCACTTACATCAGTTTCCGTAAGAAAACAGTAACTTAAGAAAACCTATAAGGGACT  
GGAAGGGCTACAAAGTTCTGAGAGTGTGGACACTATGTGGACACTCAGAAGGGAAATTTATAACGTCCT  
CCGCCTTTAGAGGATTCAGCGCGACGGCATTTCAGGTAGTCAGGCGCAAGGTGCGCATAGGCCATCG  
TCTGCTGAATGCTCGCATGTCCAGAATCTGTTGCAGTGCATTATATTGCCCCATTATCATGAAATGGC  
TTGCGAATGTATGCCGAGGATGTGGGTTGCCTGATTGGGTGGTATATCTGGCTTCACTCTGCGTAAAATC  
CCGCAAA**ACTTCTCATAATCAACTTTGAATAA**TTTAGCGCTGGCCTCCTTTAACTTTTTCTCCAGTTCCTC  
AGAAATCGGCACGGTTGCTTTTTACCGTTTTGGTTTTAGGAAGGTAACCCTGCAATTTGTAATCTGTGC  
TGTTTTAGCGTGGAACCTCCGTCCATCTTCTCCAGTGCTCAGACATAAAAGTGCGACAAGTAAGTCATC  
ACCATCCAAAACATTTAACAGTTTTTCGATTTCTGCTTTTTCCAGGAACGTCATTCAGGGTTGGCCTCCGCC  
AGTGGCGGCAGTCCGTGAATTGGGTGTTGCCCGGAAAATTCATCCAATTGAATTAATTTGTGAACATGCC  
GGATAATCGGTACATGTCACGTTTATCGTTGCGGCACTGATACCATCACGTAGTCGCATGGAACGATAAT  
CCATCAAAGCTTTTTGCTCATCCGGCTCACTGGTATATCACCTATGCCGCTGATGGTTTTGAGCAGATGAT  
TAAACTCTTTGTTCCATGCTCGTGGTTTTGCCCGTGATATTTCCACCAGATGTCCAGCAACTCACTCAAAGT  
TCTGCGATCTGCTCGCTGACCTGCCATTCTTTCTGGCTGGCGTAGGCGATTGTGTATCGCTCAAATGCTAC  
AGCCTCAGCTTTTTCTTTCAAATTTCTGCGGATGCGTTTTCCGTCGCGACCGCGAGGTCTAATGTCCACTTCA  
TAGCGTCCATCATCGAGCTTCTTAATTGACATAAGAAAGCCCTCTGACGCTGTATTACCATCTTGGTAACA  
AATGGTGAAAATATAATGTTTATATAGTGTAAACCAGTCTGTTTTCCGAGTGGTCTGATTCTGTTGGTTTTT  
GCCCAATGTGTGCGAGAGCCGGCGCGATCTGACCAGCTTGTTGGTGACGTATCACCAGTCATTAACCAGAG  
CGTATATTTTTAAATAAAGGCGTATTTGTGACTCGCATAACGATGCTGAGACCAGGGTCTTTATGCCCACT  
TTCGTAATTTTTGACTGTTCTAGAGCTATCCCGCTAATTTGCTGAATTT**CGCCTGTGTTAAGCCTTCTG**CTT  
TCCTAATCGCTTTAGTTTTTCGAATGTCTGCATTTGACAGTAACCTATTGGTGACTTATATTCCCGTCAAAA  
GGTTGTGATTGGTGACCTT**TGAGTGTGTTAGCCAGTCC**CTAGAAAGGACAGGGGCGACCTAGAAGGGA  
CTGGATCTAATAAGGGTAACACGAAAGCAAAAAGGGCTAATCAATGGAAGTCAATGACTATGTGATTGAG  
TACCCGATTGATGCGGTACATACGGTTAAGTTTGCAGAGTTACTTGTAAGCCAGAAACGGCTGTAGTCGT  
CAAGATGTCAGCGCCAGTGATATAAGACGGTAATTCGCCATTTGGATTGTCCGCTCCACCCAACATGTTGT  
TCCTTAAGGTTCTCACACCAGAAAGGACATCAACATGCTGAGCAGAGAGGACTTTTACATGATAAAGCAAA  
TGCGCCAGCAGGGCGCGTACATCGTCGATATTGCGACTCAGATTGGTTGCTCTGAACGGACGGTCAGACG  
CTACCTCAAATACCCTGAACCGCCAGCCAGAAAGACCCGCCACAAAATGGTTAAGCTGAAACCGTTTATGG  
ATTACATCGACATGCGCCTGGCAGAGAATGTCTGGAATAGCGAGTTATCTTCGCGGAGATTAAGGCAAT  
GGGTTATACGGGCGGACGTTCCATGCTGCGTACTACATCCAGCCAAACGTAATAATGCGTCCGTCAAAAA  
GAACAGTTCGTTTCAAACCTCAGCCTGGATAACCAGCTCCAGCATGACTGGGGCGAAGTTGAGGTGGAGGT  
TGCCGGGCAACGGTGCAAAGTTAACTTTGCGGTTAATACGCTGGGGTTCTCCCGCAGCTTCCATGTCTTCG  
CCGCACAAAACAGGATGCTGAGCATACTACGAATCACTGGTTCGCGCCTTCCGCTACTTCCGTGGTTGT  
GTGAAAACGGTGCTGGTTGATAACCAGAAGGCTGCGGTGCTGAAGAATAACAACGGGAAAGTCGTGTTCA  
ACTCCGGATTCTGTTGCTGGCTGACCACTATAACTTCTGCCACGGGCATGCCGTCCACGCAGGGCCAGA

ACAAAAGGTAAGGTTGAGCGGATGGTGAATACTCAAGGAGAACTTCTCGTCCGGTACCGCAGGTTCCG  
ACAGCTTCACTCATGTCAATCAACAACCTGGAGCAATGGATAGCCGATGTGGCTGACAACCGGAGCTTCGC  
CAGTTCAAAGAAACGCCGGAACAGCGCTTCGCGCTGGAGCAGGAACATCTGCAGCCGTTACCGGATACAG  
ACTTCGATACCAGTTACTTCGATATCCGCCATGTGTCTGGGACAGCTATATCGAGGTTGGTGGTAATCGTT  
ACAGCGTCCCGAAGCGCTGTGTGGTCAGCCGGTATCGATACGAATATCGCTGGATGACGAGTTGCGGAT  
CTACAGTAATGAGAACTGGTGGCCTCACATCGCCTCTGTTGAGCATCGTCTGGCTGGCAGACAGTGCCGG  
AGCATCACGCCCCGCTCTGGCAGCAGGTGAGTCAGGTGGAACATCGACCACTGAGTGCCTATGAGGAGCT  
GTTGTGATGCATGAACTGGAAGTCTGCTGAGTCGCTGAAAATGGAGCATCTGAGTTATCACGTTGAAAG  
CCTGCTGGAACAGGCAGCTAAAAAGAGCTGAACTACCGGGAGTTCTGTGCATGGCGCTACAGCAGGAA  
TGGAACGGCAGGCATCAGCGCGGTATGGAGTCCAGGCTGAAGCAGGCTCGTCTGCCGTGGGTCAAACG  
CTGGAGCAGTTCGACTTTACCTTCAGCCGGGCATCGACCGTAAGTTGTCCGGGAACTGGCTGGTCTGGC  
GTTCTGTGGAGCGCAGCGAAAACGTGATCCTGCTGGGCCCTCTGGTGTGCGAAAAACTCATCTGGCCATA  
GCTCTTGGCGTGAAAGCGGTGGATGCGGGACATCGGGTACTGTTTATGCCACTGGACAGACTGATCGCGA  
CACTGATGAAAGCGAAACAGGAAAACCGGCTGGAGCGTCAGCTACAGCAACTGAGTTATGCCCGGGTGT  
GATCCTGGATGAAATAGGCTATCTGCCGATGAACAGAGAGGAAGCCAGTCTGTTCTCCGGCTACTGAACC  
GTCGATATGAAAAGCGAGCATCATACTGACGTCAAACAAAGGGTTCGAGACTGGGGAGAAATGTTCCG  
AGATCACGTAAGGCAACAGCGATCCTGGATCGGCTGTACATCACTCAACCACGCTGAATATCAAAGGAG  
AGAGTTACCGGTTAAAGAGAAAACGTAAGCTGGAGTGCTGACCAAAAACACAACGCCAATCAGTGATGA  
TGAAATGGTGAAAGCGGACAGCATCAGTAACGAAAGTATTTAGCGGGCATGAAAATGGCAAATAACGG  
TCAAACATCGTGCGTTGACAAAGATGGTAAAAGAGAATAAATTGCCAGTTATTGAGCTTCGTGATCCAAG  
TAAGCCGAACGCTCGTGTCCGGTGAGAAGTGGGTTTTTCATTCCAGAGTTAATCGCGCTGTACGAGAGGCGT  
TTTATAACCGACCAGTTGAACAGCGTGATGCATGGCTTTTGTGGATGGGGTTGTGATTATGAGTGAACCGC  
GTTGTATTGCTCAGTTACTGCGTAACGAAAGCCCAAGGGCGATTGACTTCACCATCACCCACGGTAAGGGG  
CGTAAGGGAATCATTATCCGCACCAAAAACAGAGTCCGTTAAAAAAGGCTCTGACCTTTCTGAAAAGCCG  
GAGGGTATGGAAATGACAGTGATGACGCTCAATCTCGTTGAAAACAGCCAGCAGCTATGCGCCGGATAA  
TTGGTAAGCATCTTGCCGTTCTCGCTGGCAGGATACATGTGATTATTATAATCAGATGATGGAGCGCGAA  
CGGCTAACGGTTTGCTTTTCATGCGCAGTTAAAACAGCGTCACGCAACGATGCGTTTTGAAGAAATGAACGA  
CGTCAACGTTAACGGCTGGTTTGTGTAATTGATGAATTGCGTGGGGCATTCTCAAACCGCCGTCAGGTTG  
GCGCAAGTGAGTATGCATATATTAGTTTTTAAACAGTCAGTCAGCGTCGCACCTTTATTTATGCATGCCGGAT  
TGAAGTGAATAAATTCAACCAGCCATACTGGCGAATTAATGAAGAGTCATGTTACTGGCGTGATGCTTTA  
TTCCGTGCATTACGTGAATTATTCAGCCTGTTTGTGATGACCGACAATTCTGACGTCGGTAAAACAGAG  
CAATATCTGCATTAAGTAATTAACCAGAGTTTTTAAACGCACTTAATTGTGCGGGGCTCTTTTTGCCTGGAG  
AAAGTCATGCATACAGTTCTGAAAATCAGTGCAGTAAATACGCATTACTGCTGCAACAGGCCAGAACCGA  
AGCACAGGCCGACGCAGCGACGCTTTTCTTCTCATCTTGACGCCATGATTCCACATCACAAAGGCGG  
AGTTATCCCGCGTAGAGATAGTCGAGCTGCTCAGTCAGGAGTCGGAAAAATTTACAATATCGGATTGTCT  
CGCGGGGAGGTGCTTTGATGTCCTGTTCTCGTTGATTGTTACTGAATAACGCCTTAAAAATCACCGTTA  
TGAAAAATGGCGATCTATCTTATTCAACTTGGTCTTGATAAAGAAAAACGCGAAATAACTGAGTCTGTTA  
TCGCGATTTATCAGAACGAATTAACCTCCTGTCTGATGTGGTCAATTTACTTGTAAACGCGCTGTATTCA  
CAAGCAAAATTTCTCCGTGGATGAACTGACGAAATTAACGACAGAAATCGCCAGCTATTGCGCTGATGAAT  
TTAAAAACTGAACGACAAAAGGAACTGGTAATGCCGACAACGTAGATTTTATTAGGAACAACAGGCT  
GAATTAAGTGGAGCGCCAGATTAACGCGCAAGGGTAAAACATTGCGGTGCTTCTGCGCTGGTTTGCAGG  
AGTGTGACGCGCAATACCTGCTGCCGTCGTGCGGCTTATCCGTCAGCCACGCGTTGTGTTTCTGCCAGT  
CAGTCTTTGAAGCAAAAACAAACATTACCGGAGAACGGCATGAGTATTGATTGAAATTGGCGAACGTT  
ATGTCGTTACCAGTGACAGCTTTCAGTTTATTCTCCACGAGAAAAAGAGAGCGGAAAGCGGTAAAAACGGC  
GGTCAGGAATGGCTGGCGGTGGTTGGTTATTACCCGAAATTAAGCCAGCTCGTTTCCGGCCTGATGCATCA



CGATATTCTGACCGGAAGCGCAAAGTCTTTTGTGATTTAAACGCGCAGGTTGAGCAACTCAGCAAGCGTT  
GTTTCAGAGGCTTTTGGCTCATATGGCCGTTAAAGCCTCCGGGCGTTTTGTCCCTCCGTCAGCATTGCGCGA  
GGCACCGGTAAGGCGTTTACCGGTGCTTATGCATGGAACGCGCCACGCGAGGCGTCGGGCGCGAAAGA  
CCCCTTACACGTGACGAGATGCGTCAGGTGCAAGGTGTTTTATCCACGATTAACCGCTGCTTACTTTTTG  
CGCTCGCTGTTTACTTCACGCTATGACTACATCCGGCGCAATAAAAGCCCGGTACACGGGTTTTATTTCTC  
ACATCCACTTTTTCAGCGTCGTTTATGGCCGCGCATTGAGCGTGTGAATCAGCGCCATGAAATGAACACCGA  
CGCGTCGTTACTGTTTCTGGCAGAGCGTGACCACTATGCGCGCCTGCCGGGAATGAATGACAAGGAGCTG  
AAAAAGTTTGTGCCCGTATCTCATCGCAGCTTTTCATGATGTATGAGGAACTCAGCGATGCCTGGGTGGA  
TGCGCATGGCGAAAAAGAATCGCTGTTTACGGATGAGGCGCAGGCTCACCTCTATGGTCATGTTGCTGGC  
GCTGCACGTGCTTCAATATTTCCCTCTCTACTGGAAAAATACCGTAAAGGGCAGATGACCACGAGGCA  
GGCATATTCTGCCATTGCCCGTCTGTTTAAACGATGAATGGTGGACTCATCAGCTTAAAGGCCAGCGTATGC  
GCTGGCATGAGGCGTTACTGATTGCTGTGCGGGAGGTCAATAAAGACCGTTCTCCTTATGCCAGTAAACAT  
GCCATTCGTGATGTGCGTGCGCGCCAGGCAAATCTGGAATTTCTTAAATCGTGTGACCTTGAAAACAG  
GGAAACCGGCGAGCGCATCGACCTTATCAGTAAGGTGATGGGCAGTATTTCTAATCCAGAAATTCGCCGG  
ATGGAGCTGATGAACACCATCGCCGGTATTGAGCGTTACGCTGCCGAGAGGGTGTATGTGGGGATGTTTA  
TCACGCTGACCGCGCCGTCAAAGTATCACCCAACACGTCAGGTGAGAAAAGGCGAAAGCAAACCGTCCA  
GCTAAATCACGGCTGGAATGATGAGGCATTAATCCAAAGGATGCGCAGCGTTATCTCTGCCGTATCTGGA  
GCCTGATGCGCACGGCATTCAAGGATAATGATTTACAGGCCTACGGTTTTCGCTGTTGTTGAACCACCCAC  
GACGGAACGCCGCACTGGCATATGATGCTTTTTTGTAAATCCACGCCAGCGTAACCAGATTATCGAAATCAT  
TCGCTCGCTATGCGCTCAAAGAGGATGGCGACGAAAGAGGAGCCGCGCGAAACCGTTTTTCAGGCAAACA  
CCTTAACCAGGGCGGTGCTGCGGGGTATATCGCGAAATACATCTCAAAAAACATCGATGGCTATGCACTGG  
ATGGTCAGCTCGATAACGATACCGGCAGACCGCTGAAAGACACTGCTGCGGCTGTTACCGCATGGGCGTC  
AACGTGGCGCATCCACAATTTAAAACGGTTGGTCTGCCGACAATGGGGGCTTACCGTGAACACTACGCAAT  
TGCCTCGCGGCGTCAGCATTGCTGATGAGTTTGACGAGCGCGTCGAGGCTGCACGCGCCCGCAGACAG  
TGGTGATTTTTCGTTGTATATCAGCGCGCAGGGTGGGGCAAATGTCCCGCGGATTGTCAGACTGTCAGG  
GTCGCCCCTAGTCCGTCGGATGAAGTTAACGAGTACGAGGAAGAAGTCGAGAGAGTGGTCGGCATTACG  
CGCCGCATCTCGGCGCGGTCATATTCATATCACAGAACGACGACTGGCGTATTGTGCCGAAAAGTTCCG  
GTCGTTGAGCCTTTGACTTTAAAAGCGGCATCGCCGCGCCTCGGAGTCCTGTCAATAACTGTGGAAAAGCT  
CACCGGCGGTAATACTTCGTTACCGGTGCTCACGCCATCTGAGCACGCCGAGCAGTGCTAAATCTGGTTG  
ATGACGGTGTATCAAATGGAATGACCCGGAGGTCGTGAGGGCGCTCAGGGGTGCATTAACACGCGCCT  
GAGAACACCAAATCGTCAGCAGAGAAACGGAAGCCCGTTAAAACCACATGAAATTACCCATCGGCCAGA  
CTGACCCGGTTCGGAAGAATGCAAATTACCCGTATCCGCGTTGACCTTGCTCAGAACGGTATCAGGCCGCA  
GCGATGGGAGCTTGAGGCGCTGGCGCGTGGGGCAACCGTAAATTATGGCGGGAAAAAATTCACGTATCC  
AATCATTGATGAGTGGCCGGGTTCAATAACCAAGTGTGAGTTGGAACATAAGATAAAGTAAGGGGAAGCC  
ATTAACCTTACCCATTATGGTCAATGCTTTGTTATATGCCCGGCTAAATGCCGGGCAATGATGTGATTAAT  
AATAGGCGATTCAAGTATTAATGGATTCAACATCCATAAATGGCTCTGTGGTACAACCTCAAATGGTTTTTT  
GAAGTCAGCAATGCATTTCCCGTTTTCAAACCTAACCCTGTTTTTACTATCTAAGAAACATAATCCAGAC  
AGAACACTTTTGAATTTGTACCGCACCTGTTGTTGAAGGTATGAGAGAAAACAGAGTTTTCTTATCTGTCGGA  
TTACACGTCATTTTTAGCAGATTTTTTCCATCAGGAGTCCCTAAACATTGGTCTGTATTTGGGGTTCGAATCA  
TTATCCACCCGCTTTGATCGGTAACAAGAGCTTCAGCTGGTGTTTTTACTGGTACAACCTCCCATCCAGTGAT  
TTCTCTGCCATGCAGATCTAGTCTGTTATGGAGCATCAGGCCACTTTGGAGATTGCGGAATGTGAATAGAG  
AGTTATTTTCTTTTCTAACTCATCTATCTGATTATTGACAGCTTCTGTGATGAGGAGCATCCGGATATTAG  
CAACATAGTTACAATAATTATTAATCTTTCATTATGATAGCCTTTTTATCGTCTGGAACGCCAACAGGGT  
AATGGTCTGAAGACATCTGAGTCCTTCTGGCTCCGTATACAATTCCTGCTTGTAGCGGAAATGGTCTAAAG  
GCCACAGCGTTTCTGCTACTGCATAATCTAATGTTGTTGACTCGTTTGTGTCGGTGCAGCAGGGAAAATA

ATTTCTGATGCATTTCTTACAGGAAGTGTAAAGTTACCTCTAAATCATCAGGTTTCGCGATTAAAATCACCA  
 AGAATCATCCAGTTAATGGCCTGGTGGACTGGGTCTCGGCTGTCACGAAAGAAGCTATAGACTTCTTCAAC  
 AAGAGCGGGAGCGTCATTGTTTCGCGTAGCTATCGCATGTGCAGTGAAAAATGCATCATTGCCAATCCGTA  
 TGCCAAGCAATGGCCGCCACCTTGTCTTACCGGGCGAAGAACAAACACTTCATCGGCCTGCCGATTGCTA  
 ACCAGAGCAAGATTGACCCTTCCACCAAAGGCATCAACAGCAGAAAAATATATATAT**ACTTGCTGTGGTCT**  
**GCTATTTGT**AGACAAGTTCCAGATAAGCTCCCGGACAGGAATGCCTGGGGAAGGAATAACTCTACCTGTAT  
 CTACAGCCGTTGATGGCGGAGAACCTGCCTCCTGCACAGCTAAAATATCTACGGCATTTCACCAGAAATTA  
 ATTGTCGGACATTTATATTCCATTTACTTTCAGTAGTGGCGGATGCGCCCTGAAGTTCCAGGTGCGAACGC  
 GAAAATCAGTTAAATCCGCCTGAGCGTAAACGATAAAAATACTATCAGAGATATAATATATTTTTTCATTG  
 TTCGCCTCCTGCTGAATGCCTATCTGGTTCTATTGGTAGTGGTGGAAATGGGCGTATTTCTGGCTTAAACAT  
 AGTGGCTAGAGCTGGCCTTAATGGTTTCGTTATGGACCACATAAATTCGAAGTTTCTCTCTCCACTTGATGG  
 GCAACGCTCCATTGTTAATGTTGTTGCGTACGGAGATGATGGTGTCTTTCTAAAAAATTAGCTCTGATGCA  
 TAAACCTGTAGACAACGATTTTAACTGGTAATTACCATTGCGTGTACCATCGGCTGGAAGTCGAAGCGAT  
 CTGGTCCAAACTGGCAAGGTGCAGTAGATAGTTGCACACCTCTTTAAACCCCGGGAAGCTTGTACATAAA  
 GTACCAACGTCTACATTGCGGAACTGTATCGTATTTGGTCTGGTCCGGGCATAATCTGCCAATTGCGTAGT  
 TCTCCAAATGAATTGGAGTCGCTGATATAATAAGCCATAATGATGAACCAGTCCGCGGCTCCACATTGTT  
 AGAACTGAGCCATCCATGTTTCATCAAAGATACTGCGGGTGTGTACCTGGTACCGGGATAGGGATTGGTG  
 CATTGTGGGAAGTGCAGGTCCAGCCCCGGTAATGGAAGTCCAGGCTCATCTGGAGAAGGAATTGTTGG  
 TCCTCCCTCTACTTGAGGAGGGAAAACCTTTGGGGTCAAGATGAGCTTTGTTCTTTCTGATGAGCAGCCATT  
 TAATAAAATGGGAGCAGGATACCAGCTATAAAAATAGGTGTGTATTTATTAGCCATTATTACAGTCTGT  
 TATGATAAAGATAGTGAAAATTAATAAAAAATAAAATTATCACATTGGCAAATCTCCTTTGGGCTAGTGTCT  
 TAGTTGTTTGGTTTTCTTAGGGGTTTTATAGTGAATGTTTTTAAGTGTATTATTTTTGAAGTTACATTTGAG  
 GTTGTGATTAATAAGATAAGACTAAATAAGGGTATGTAACCTAAATGTAATTGTTTTTAAAATGAAAATAAT  
 AAGTGTGCTGCTTTTATTTAATGTTTTTGCTTTTTTATTTAATCGCTTTTGTAAATTTATAAAGTTACCGTGAG  
 TGCAAACGCGATTGATATAGTTATGAATTTACAAATGATGAGCTACAGGTCAATTGTTAGTTCTTATTTATG  
 TGATCTTGATGGTTTTTTGTTAATAATGTTATTGAGATCGTATAGGTTGTGTGTTATTGGTCAATTTTCTAT  
 CGCTGTTTTTTGTTGTGAGTGTCTGATGGCATGAATTTGCATGTGTCAAAGTTGCTTTTATTGTCAGTTATC  
 GTAAGTGTGGCGTGCTCTTGGAGTGTCCATGCACCTGCATTAACCGCCCCGTGAAGCGGGCGGGG**CG**  
**AGGCGGGGAAAGCAC**

En color, se encuentran marcados los cebadores correspondientes a cada uno de los fragmentos de la secuencia testados por PCR, que se encuentran superpuestos:

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| 1a: <b>GGCGAGGCGGGGAAAGCACT</b> | 1b: <b>CACTCCGCTGACATCCACCA</b> 1259 pb      |
| 2a: <b>CGGCGATCGAGTACCGGCA</b>  | 2b: <b>TGACCGGTGACCCGATTGTC</b> 1230 pb      |
| 3a: <b>CTCTGTGAGGCCATACCTGA</b> | 3b: <b>CGTCAGGCAGGATGCCGC</b> 1163 pb        |
| 4a: <b>GTGTCATCAGTGCGCAGGAT</b> | 4b: <b>TGGCGTTACGGACACGGAGC</b> 1252 pb      |
| 5a: <b>ATGCGACCAGATTAACCTCG</b> | 5b: <b>CACAGACTCACCGGCAGC</b> 1204 pb        |
| 6a: <b>CGCCGTACATGTTACCGA</b>   | 6b: <b>CAGCCACGGGCGCGGTCT</b> 1169 pb        |
| 7a: <b>TGCTGCCGCACGGCACC</b>    | 7b: <b>CCGGCAGCGACCAGCGAGAT</b> 1196 pb      |
| 8a: <b>GGCGGGAGCTGCCGCCT</b>    | 8b: <b>CCATTGATATACAGCTCCATCGGTC</b> 1194 pb |

9a: TGCATGTGAAGAATATCCCG	9b: GTTATGGGTGTGCAGTACCT 1204 pb
10a: CAACAGGCTGATTACCGGCA	10b: CGGCAGCAGCGCGGATG 1214 pb
11a: AGGACGTGAGGCCGGTG	11b: GGCAAGAGCTGGCTTATAACT 1203 pb
12a: ATCGCAGAGCTGGTTATCC	12b: CCGTGTAAAAATGCAGCACCAT 1207 pb
13a: ACTGGGACAGTGGTGCTTAT	13b: TGACCAGAACACTGTAGCGT 1203 pb
14a: CTGGAGCGCGCTGTCAGGC	14b: ATTTTCATCCTTGCAGGAATA 1190 pb
15a: ATATGACTGAGTTTTAACTCGCGG	15b: CACGCAGACCCAGCGCA 1213 pb
16a: AGCCTACCGCCAGAATTCAG	16b: CTCCAGCCGGTCGACGCC 1174 pb
17a: ATCTCCGTGGTCTGCACCTA	17b: GGGCATCAGCAACTTAACTC 1244 pb
18a: CCGCAGTCAAACAGCGTTATCA	18b: CCCATTGCGCCTGCTAC 1219 pb
19a: CTCATTGTCGGTAGCGCG	19b: GGTGAGTGACAGCGTAAAATCAAT 1205 pb
20a: GCCGTTGCTGGATGGTACCG	20b: CGACCGGTAGCCAGGCTGAT 1226 pb
21a: ATATGCCACGAAAGCGCAG	21b: CACAGATTACAAATTGCAGGGT 1216 pb
22a: ACTTCTCATAATCAACTTTGAATAA	22b: GGACTGGCTAACACACTCAA 1190 pb
23a: CGCCTGTGTTAAGCCTTCTG	23b: TGTCAGCCACATCGGCTATC 1212 pb
24a: GTTGAGCGGATGGTGAAATA	24b: ACTCCAGCTTACGTTTCTCTT 1222 pb
25a: AACAGCGATCCTGGATCGGCT	25b: CGAATCATGGCGTCAAGATGAGA 1242 pb
26a: GAA AGTCATGCATACAGTTTCTG	26b: AAGGCAGGCGGTTAATCGT 1200 pb
27a: ACGCGCCACGCGAGGC	27b: AGCGCATAGCGACGCATGAT 1180 pb
28a: GCGTGTGTTGAACCACACC	28b: GCCGGGCATATAACAAAGCA 1191 pb
29a: TGATGAGTGGCCGGGGTTCA	29b: GGCATTCCCTGTCCGGGAGCT 1260 pb
30a: ACTTGCTGTGGTCTGCTATTTGT	30b: GTGCTTCCCCGCCTCG 1681 pb





