



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO Y POSTÍTULO**

**“ASOCIACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN
DE BIOPELÍCULAS Y LA PRESENCIA DE GENES
FIMBRIALES Y AUTOTRANSPORTADORES EN
AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE
TOXINA SHIGA (STEC) OBTENIDAS DESDE CARNE
MOLIDA Y HECES DE BOVINOS EN CHILE.”**

María Fernanda Jiménez Fernández

**Tesis para optar al
Grado de Magíster en
Ciencias Animales y Veterinarias**

**Santiago, Chile
2019**



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO Y POSTÍTULO**

**“ASOCIACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN
DE BIOPELÍCULAS Y LA PRESENCIA DE GENES
FIMBRIALES Y AUTOTRANSPORTADORES EN
AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE
TOXINA SHIGA (STEC) OBTENIDAS DESDE CARNE
MOLIDA Y HECES DE BOVINOS EN CHILE.”**

María Fernanda Jiménez Fernández

Tesis para optar al

Grado de Magíster en

Ciencias Animales y Veterinarias

Director de Tesis: Magaly Toro Ibaceta, PhD.

**Santiago, Chile
2019**

INFORME APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

María Fernanda Jiménez Fernández

“Asociación entre la capacidad de formación de biopelículas y la presencia de genes fimbriales y autotransportadores en aislados de *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC) obtenidas desde carne molida y heces de bovinos en Chile.”

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, en Examen de Defensa de tesis rendido el día xx de xx del 2019.

Director De Tesis

Dra. Magaly Toro I.

Comisión Evaluadora E Informante De Tesis

Dr. Patricio Retamal M.

Dra. Lisette Lapierre A.

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Probióticos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA) con el financiamiento del proyecto Fondecyt 11150491 y con el apoyo del Dr. Christopher Hamilton-West M. de la Unidad de Epidemiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal y del Dr. Luis Pablo Herve Claude de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile .

BIOGRAFÍA

Nací en Santiago, Chile el día 28 de noviembre de 1990. Crecí desde los 3 años con mis padres y mis tres hermanos en el centro de Santiago. Mi educación básica la desarrollé en el colegio de religiosas Filipenses y desde 7mo a 4to Medio en el Liceo N°1 “Javiera Carrera” donde conocí a mis dos mejores amigas. Siempre me gustaron los animales, sin embargo, fue en 3ero medio cuando me di cuenta que la Medicina Veterinaria era lo que quería estudiar. Mi tata fue mi principal influyente y motor para estudiar Veterinaria.

Ingresé a la carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad de Chile donde conocí maravillosas personas. Sin embargo, mi desarrollo personal más grande fue pertenecer y participar de la organización de los Trabajos Voluntarios Veterinarios (TVV) que me mostró el maravilloso mundo de la Agricultura Familiar Campesina al cual espero dedicar toda mi energía y conocimientos en el futuro.

Gracias a AGROCAMPUS virtual he podido realizar dos extensos cursos, “La Agricultura Familiar Latinoamericana, Historia, Actualidad y Perspectiva” y “La Calidad de Canal y Carne Ovina”, dos cursos de Montevideo, Uruguay a distancia.

Ya en los últimos años de la carrera decidí ingresar al Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias de continuidad para especializarme en el área de Bienestar Animal. Este programa me permitió realizar el Diplomado en “Epidemiología Veterinaria Aplicada” y gracias al INTA pude realizar el Diplomado en “Aplicación del Sistema HACCP para la Producción de Alimentos Sanos y Seguros”.

Esta tesis la realicé bajo la tutela de la Dra. Magaly Toro, quien me permitió colaborar en el proyecto FONDECYT N° 11150491, presentar resultados en el XXXVIII y XXIV Congreso Chileno de Microbiología ALAM (2016-2018) y formar parte de una publicación: Toro, M.; Rivera, D.; Jiménez, M.; Díaz, L.; Navarrete, P.; Reyes-Jara, A. (2018). Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, Chile. *Food Microbiol.* 75, 55-60.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

INDICE DE CONTENIDOS

| | | |
|---------------|--|----|
| <u>1</u> | <u>INTRODUCCIÓN</u> | 17 |
| <u>2</u> | <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> | 19 |
| <u>I.</u> | <u><i>Escherichia coli</i></u> | 19 |
| <u>2.I.1</u> | <u><i>Escherichia coli</i> Productora de Shiga Toxina</u> | 20 |
| <u>2.I.2</u> | <u>Factores de virulencia de STEC</u> | 23 |
| <u>II.</u> | <u>Biopelículas</u> | 25 |
| <u>2.II.1</u> | <u>Formación de biopelículas de STEC</u> | 25 |
| <u>2.II.2</u> | <u>Proteínas importantes para la formación de biopelículas en STEC</u> | 27 |
| <u>2.II.3</u> | <u>La industria alimentaria y las biopelículas</u> | 30 |
| <u>2.II.4</u> | <u>Estudios en biopelículas de STEC</u> | 31 |
| <u>2.II.5</u> | <u>Rol de las biopelículas en la sobrevivencia de STEC en el ambiente</u> | 33 |
| <u>3</u> | <u>Hipótesis</u> | 35 |
| <u>4</u> | <u>Objetivo general</u> | 35 |
| <u>I.</u> | <u>Objetivos específicos</u> | 35 |
| <u>5</u> | <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> | 36 |
| <u>I.</u> | <u>Objetivo 1. Caracterizar genotípicamente aislados STEC obtenidos desde carne molida y heces de bovino.</u> | 36 |
| <u>5.I.1</u> | <u>Aislados bacterianos y ADN control</u> | 36 |
| <u>5.I.2</u> | <u>Extracción de ADN desde aislados</u> | 36 |
| <u>5.I.3</u> | <u>Confirmación de especie a través de PCR</u> | 37 |
| <u>5.I.4</u> | <u>Caracterización genotípica: presencia de factores de virulencia <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂, <i>hlyA</i> y <i>eae</i>.</u> | 37 |
| <u>5.I.5</u> | <u>Análisis de los resultados</u> | 39 |

| | | |
|---------|---|----|
| II. | <u>Objetivo 2. Determinar la capacidad de formación de biopelículas de aislados STEC de carne molida y heces de bovino.</u> | 39 |
| 5.II.1 | <u>Selección de aislados</u> | 39 |
| 5.II.2 | <u>Ensayo de formación de biopelícula</u> | 39 |
| 5.II.3 | <u>Análisis de los resultados</u> | 41 |
| III. | <u>Objetivo 3. Analizar la asociación entre la presencia de determinantes genéticos fimbriales y autotransportadores, y sus polimorfismos, con la formación de biopelículas en aislados STEC de carne molida y heces de bovino.</u> | 42 |
| 5.III.1 | <u>Secuenciación del genoma completo de aislados STEC</u> | 42 |
| 5.III.2 | <u>Identificación de genes asociados a formación de biopelículas</u> | 42 |
| 5.III.3 | <u>Análisis de los resultados</u> | 43 |
| 6 | <u>RESULTADOS</u> | 45 |
| I. | <u>Objetivo 1. Caracterizar genotípicamente aislados STEC obtenidos desde carne molida y heces de bovino.</u> | 45 |
| II. | <u>Objetivo 2. Determinar la capacidad de formación de biopelículas de aislados STEC de carne molida y heces de bovino.</u> | 47 |
| 6.II.1 | <u>Detección y cuantificación de la formación de biopelícula en aislados STEC</u> | 47 |
| 6.II.2 | <u>Caracterización de la capacidad de STEC de formar biopelículas</u> | 48 |
| III. | <u>Objetivo 3. Analizar la asociación entre la presencia de determinantes genéticos fimbriales y autotransportadores, y sus polimorfismos, con la formación de biopelículas en aislados STEC de carne molida y heces de bovino.</u> | 50 |
| 6.III.1 | <u>Identificación de genes asociados a formación de biopelículas</u> | 50 |
| 6.III.2 | <u>Identificación de polimorfismos (SNPs) en secuencias nucleotídicas</u> | 52 |
| 6.III.3 | <u>Identificación de polimorfismos en las secuencias aminoacídicas</u> | 54 |

| | | |
|-----------|---------------------|----|
| <u>7</u> | <u>DISCUSIÓN</u> | 57 |
| <u>8</u> | <u>CONCLUSION</u> | 67 |
| <u>9</u> | <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 69 |
| <u>10</u> | <u>ANEXO</u> | 85 |

INDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| <u>Tabla 1. Partidores para PCR <i>E. coli</i></u> | 34 |
| <u>Tabla 2. Partidores para PCR de factores de virulencia <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂, <i>eae</i> y <i>hlyA</i>.</u> | 35 |
| <u>Tabla 3. Categorías de formación de biopelículas según Densidad Óptica (DO)</u> | 38 |
| <u>Tabla 4. Perfiles genotípicos de aislados de heces de bovino y carne molida.</u> | 43 |
| <u>Tabla 5. Número de aislados seleccionados según perfil de virulencia.</u> | 44 |
| <u>Tabla 6. Categorías de formación de biopelículas según Densidad Óptica (DO)</u> | 45 |
| <u>Tabla 7. Categorización de los aislados STEC de acuerdo a su capacidad de formar biopelículas a 23°C.</u> | 46 |
| <u>Tabla 8. Categorización de los aislados STEC de acuerdo a su capacidad de formar biopelículas a 37°C.</u> | 47 |
| <u>Tabla 9. Presencia de genes de adhesinas fimbriales y de proteínas autotransportadoras en aislados STEC obtenidos de carne molida y heces de bovino (n=67)</u> | 48 |
| <u>Tabla 10. Número de alelos presentes por gen de las secuencias nucleotídicas encontradas en los aislados STEC.</u> | 49 |
| <u>Tabla 11. Porcentaje máximo y mínimo de identidad de las secuencias nucleotídicas de los aislados STEC encontradas para cada gen fimbrial y autotransportador.</u> | 50 |
| <u>Tabla 12. Número de alelos presentes por gen de las secuencias aminoacídicas encontradas en los aislados STEC para los genes fimbriales y autotransportadores.</u> | 51 |

| | |
|---|----|
| <u>Tabla 13. Porcentaje máximo y mínimo de identidad de las secuencias aminoacídicas de los aislados STEC encontradas para cada gen fimbrial y autotransportador.</u> | 52 |
|---|----|

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| <u>Figura 1. Distribución geográfica de aislamientos y casos de STEC en América Latina. El mapa presenta la distribución pronosticada de aislamientos de STEC en los países latinoamericanos en base a diferentes estudios epidemiológicos.</u> | 23 |
| <u>Figura 2. Representación esquemática de la formación de biopelículas</u> | 27 |
| <u>Figura 3. Frecuencia de genes de virulencia <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂, <i>hlyA</i> y <i>eae</i> en los aislados de carne molida (n=69) y heces de bovino (n=117).</u> | 45 |

INDICE DE ABREVIATURAS

- Ag43: Antígeno 43
- Al: Acero inoxidable
- CH: Colitis hemorrágica
- EAEC: *E. coli* enteroagregativa
- EHEC: *E. coli* enterohemorrágicas
- EIEC: *E. coli* enteroinvasiva
- EIEC: *E. coli* enteroinvasiva
- EPEC: *E. coli* enteropatogénica
- EPS: Exopolisacáridos
- ETEC: *E. coli* enterotoxigénica
- ExPEC: *E. coli* extraintestinales
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
- FSIS: Servicio de Inspección de los Alimentos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
- InPEC: *E. coli* intestinales
- INTA: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos
- ISP: Instituto de Salud Pública de Chile
- LB: Luria Bertani
- MAC: Agar McConckey
- MEC: Matriz extracelular
- NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos
- OD: Densidad óptica
- ODc: Densidad óptica de corte
- ON: *Overnight*
- OPS/WHO: Organización Panamericana de la Salud

- PCR: Reacción de la Polimerasa en Cadena
- PGA: b-1,6-N-acetil-D-glucosamina
- PS: Poliestireno
- PTT: Púrpura trombocitopénica trombótica
- PVC: Policloruro de vinilo
- RT-qPCR/RT-PCR: PCR en tiempo real
- SHU: Síndrome Hemolítico Urémico
- SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido
- SPSS: Sigma Stat Statistical Software, IBM
- STEC/VTEC: *E. coli* Productora de shiga toxinas o verotoxinas
- Stx: Toxina tipo Shiga
- TSA: Agar Trypticase de Soya
- UPEC: *E. coli* uropatógenas

RESUMEN

Escherichia coli productora de toxina tipo Shiga (STEC) puede causar brotes y casos aislados de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. La principal vía de transmisión es por consumo de alimentos y/o agua contaminados con la bacteria. STEC puede sobrevivir en el ambiente gracias a las biopelículas, cuyo desarrollo se ve favorecido debido a la expresión de genes fimbriales y autotransportadores. Estas biopelículas representan un gran desafío en la industria alimentaria y salud pública. Se seleccionaron 67 aislados STEC y se analizó su capacidad de formar biopelículas mediante ensayo en microplacas de poliestireno a 23°C y 37°C. Se determinó la presencia de los genes asociados a formación de biopelículas *crl*, *csgA*, *csgD*, *ehaA*, *ehaB*, *espP*, *cah* y *flu* desde los genomas de las cepas a través de alineamiento de la secuencia de cada gen con la secuencia completa del genoma de los aislados STEC. También se determinó la presencia de polimorfismos en la secuencia aminoacídica de los genes en los aislados. El 91% de los aislados (61/67) formaron biopelículas. El 73% (22/30) de los aislados de carne formaron biopelículas moderada a fuerte, versus el 59% (22/37) de los aislados de deposiciones de bovinos. Sin embargo, la capacidad de formación de biopelículas no dependió del origen de los aislados. El 100% de los aislados resultaron positivos a la presencia del gen *crl*, el 99% (66/67) para *csgA*, y *csgD*, 97% (65/67) para *fimH* y 94% para *ehaA* (63/67). El gen *cah* estuvo presente en 3% (2/67), el gen *ehaB* en 35% (52/67), y *espP* y *flu* en 61% (41/67) de los aislados. Mediante el coeficiente de Spearman (ρ) se observó que a 23 °C solo el gen *fimH* mostró una asociación con la capacidad de formar biopelícula, pero no se observó asociación a 37°C. Además, no se observó asociación entre alelos específicos de las secuencias aminoacídicas y la capacidad de formar biopelículas para ningún gen. La capacidad de formar biopelícula de estos aislados y la falta de correlación con la presencia de genes fimbriales y autotransportadores sugiere que son necesarios mayores estudios que ayuden a comprender la complejidad de estas comunidades celulares.

Palabras claves: STEC, Biopelículas, genes fimbriales y autotransportadores

SUMMARY

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) can cause outbreaks and isolated cases of diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. The main route of transmission is through consumption of food and/or water contaminated with the bacteria. STEC can survive in the environment through biofilm formation. Biofilms prosper due to the expression of fimbrial and autotransporter genes. These biofilms represent a big challenge in the food industry and public health. We selected 67 STEC isolates to measure their biofilm formation ability by growth in polystyrene microplates at 23 ° C and 37 ° C. We determine the presence of genes associated with biofilm formation (*crl*, *csgA*, *csgD*, *ehaA*, *ehaB*, *espP*, *cah* and *flu*) by aligning the gene sequence with the complete sequence of the STEC genomes. The presence of polymorphisms in the aminoacidic sequence was also determined. Most of the isolates studied (61/67; 91%) were able to form biofilm. Seventy three percent (22/30) of the meat isolates formed moderate to strong biofilms versus 59% (22/37) of bovine fecal isolates. However, the biofilm formation capacity did not depend on the origin at any temperature. All isolates (100%) carried the *crl* gene, 99% (66/67) was positive to genes *csgA* and *csgD*, 97% (65/67) tested positive to *fimH*, and 94% to *ehaA* (63/67). The *cah* gene was present in 3% (2/67) of isolates while the *ehaB* gene was present in 35% (52/67). Finally, *espP* and *flu* were carried by 61% (41/67) of the isolates. At 23 ° C, only the *fimH* gene showed was linked to the isolate ability to form biofilm (Spearman coefficient (ρ) analysis), and no correlation was observed at 37 ° C. In addition, specific amino acid sequence alleles did not associate with the ability to form biofilms for any gene. The ability to form biofilms of these isolates and the lack of association with the presence of fimbrial and self-transporter genes suggests that further studies are needed to better understand the complexity of these cellular communities.

Keywords: STEC, biofilm, fimbrial and autotransporter genes.

1 INTRODUCCIÓN

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Henderson, 2008), habitante normal de la microbiota intestinal de animales y humanos (OPS, 2001), aunque existen algunas variedades patógenas. Entre ellas, *E. coli* Productora de Toxina Shiga (STEC), que puede causar diarrea y complicaciones como colitis hemorrágica (CH) y síndrome hemolítico urémico (SHU), especialmente en niños pequeños. El principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga (Stx). Además, la intimina (codificada por el gen *eae*) y la hemolisina (codificada por el gen *hlyA*) están dentro de los principales factores de virulencia asociados a la patogenicidad de STEC.

El principal reservorio STEC son los bovinos, y la bacteria es excretada en las heces de estos animales. STEC puede sobrevivir en el ambiente gracias al desarrollo de comunidades bacterianas llamadas biopelículas. En la industria alimentaria, las biopelículas representan un desafío ya que son fuente de contaminación de los alimentos. En plantas faenadoras, las heces con STEC contaminan las superficies y es capaz de formar biopelículas debido a la ruptura de los intestinos durante la evisceración. Además, las biopelículas son de difícil eliminación a través de los protocolos de limpieza normales. Debido a esto, la carne se ve expuesta a contaminación con STEC durante distintas etapas del procesamiento. Dado que STEC persiste en las plantas de faenamiento gracias a la formación de biopelículas, es posible que STEC aisladas desde productos cárnicos tengan una alta capacidad de formar biopelículas. Varios genes tendrían un papel relevante en la formación de biopelículas de STEC, entre ellos los genes fimbriales y autotransportadores, que actúan en la adhesión y maduración de la biopelícula. En el presente estudio, se determinó la capacidad de formación de biopelículas que poseen cepas de STEC aisladas desde heces de bovino y carne molida, y se estudió si existía una relación entre esta capacidad de formación de biopelículas con la presencia de genes asociados a biopelículas.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* descubierta por primera vez por Theodor Escherich en 1885; es un bacilo Gram negativo, no esporulado, con un tamaño promedio de 1,1 – 1,5 μm de ancho y 2,0 – 6,0 μm de largo, y móvil gracias a que posee flagelos periticos (Fernández *et al.*, 2003; Henderson, 2008). De acuerdo con su requerimiento de oxígeno, *E. coli* es considerada anaerobio facultativo. Además, *E. coli* es capaz de fermentar glucosa, fructosa y sacarosa con producción de gas y no son exigentes metabólicamente, siendo capaz de vivir en una amplia variedad de sustratos (Fernández *et al.*, 2003). La temperatura óptima promedio de multiplicación de la bacteria es de 37°C, con un rango que va entre 7 a 50°C (Farrokh *et al.*, 2013) y un pH óptimo de 6 - 7, con un rango de 4,4 a 10 (Michanie, 2003). *E. coli* es considerada un habitante normal de la microbiota intestinal de animales y humanos (Tenailon *et al.*, 2010). Sin embargo, en 1935 se describió que una cepa de *E. coli* causó un brote de diarrea en infantes (Osman *et al.*, 2012).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, sin embargo, existen cepas que han adquirido genes de virulencia desde plásmidos, transposones, bacteriófagos e islas de patogenicidad. Estos elementos confieren a *E. coli* la capacidad de infectar y producir enfermedad (Keen, 2012). Se distinguen tres grandes grupos: las *E. coli* extraintestinales (ExPEC) (causantes de sepsis, meningitis neonatal), las uropatógenas (UPEC) (que afecta al tracto urinario) y las intestinales (InPEC) (causantes de infecciones gastrointestinales) (Rojas-López *et al.*, 2018). A éstas últimas se les denomina *E. coli* diarreogénicas, dentro de las cuales existen 6 patotipos o formas patogénicas: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (ADEC) y *E. coli* productora de shiga toxinas o verotoxinas (STEC/VTEC) (Rojas-López *et al.*, 2018).

2.1.1 Escherichia coli Productora de Shiga Toxina

Para que un aislado de *E. coli* sea considerado STEC debe poseer los genes de la toxina Shiga *stx*₁ y/o *stx*₂ (ISP, 2014). No todas las STEC son capaces de causar enfermedad; dentro de las STEC patógenas se encuentran las *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), que se caracterizan por causar cuadros graves de diarrea sanguinolenta y el Síndrome Hemolítico Urémico (SHU) en humanos, con compromiso sistémico (Nguyen y Sperandio, 2012).

STEC es considerada una zoonosis emergente de relevancia en salud pública (Etcheverría y Padola, 2013), y su principal vía de transmisión es el consumo de distintos tipos de alimentos contaminados con la bacteria (Oteiza *et al.*, 2006). El ganado bovino es el reservorio natural de STEC, y esta colonización es asintomática (Borie *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 2015; Karmali *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha evidenciado que STEC puede ocasionar diarreas en terneras (Yong-il y Kyoung-Jin, 2014) y que en cerdos STEC puede ocasionar edema, toxemia hiperaguda, signos neurológicos y la muerte de lechones (Colello *et al.*, 2016). Las estimaciones de la prevalencia de STEC dentro de los rebaños bovinos en el mundo varían ampliamente entre un 4,6% a un 75 % (Mir *et al.*, 2014).

Varios estudios han aislado STEC desde productos cárnicos en Latinoamérica. Un estudio realizado en Chile por Toro *et al.* (2018) en carne molida, identificó la presencia de STEC en un 10% de las muestras (Toro *et al.*, 2018). En Argentina se han observado incidencias de un 44% en bovinos y 52% en cerdos (Padola *et al.*, 2004). En Brasil, estudios han detectado desde 1,4 a 71% de bovinos colonizados con STEC, y en Chile se observó que un 7,5% de los cerdos y 21% de los bovinos eran positivos (Vidal *et al.* 2010; Caldorin *et al.*, 2013).

La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto directo o indirecto de los alimentos con las heces de animales portadores de STEC, las que también pueden contaminar cursos de aguas superficiales y de regadío (Prado y Cavagnaro, 2008; Xía *et al.*, 2010). Esta contaminación

ambiental es de especial importancia debido la prolongada supervivencia de STEC en el ambiente. Por ejemplo, algunos estudios revelaron que STEC puede sobrevivir por períodos superiores a 8 meses en agua contaminada con heces bovinas (Ferens y Hovde,2011).En cuanto a la contaminación de los alimentos, la carne molida y los productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos son considerados dentro de los alimentos más frecuentemente involucrados en los brotes de STEC en el mundo (Bai *et al.*, 2015; ISP, 2014; Masana *et al.*, 2011). La cadena productiva es el principal punto de contaminación de la carne. Una de las causas de esta contaminación se debe a la capacidad de STEC de colonizar superficies bióticas y abióticas a través de la formación de las biopelículas (Vogeleer *et al.*, 2014).

Se han descrito más de 400 serotipos de STEC asociados a enfermedad en humanos (Miko *et al.*, 2014). Entre ellos destaca el serotipo STEC O157:H7, el que en 1983 fue atribuido como agente causal de enfermedad en humanos (Gyles, 2007). Este serotipo es capaz de generar cuadros severos de enfermedad, incluso en dosis infectantes tan bajas como 5 – 50 bacterias (Mathusa *et al.*, 2010). La presencia de este serotipo se ha asociado a brotes de ETA en USA, Canadá, Reino Unido, China y Japón (Karmali *et al.*, 2010; Masana *et al.*, 2011). Sin embargo, estudios recientes indican que otros serogrupos han emergido como causa frecuente de la enfermedad en el mundo (Chen *et al.*, 2013). Los serogrupos O26, O111, O103, O45, O121y O145 son denominados los Grandes Seis (*Big six*), y en los Estados Unidos causan anualmente el 70% de las enfermedades causadas por STEC no-O157 y fueron declaradas adulterantes de los alimentos por el Servicio de Inspección de los Alimentos del Departamento de Agricultura (FSIS) (Chen *et al.*, 2013; Toro *et al.*, 2015). La mayoría de los brotes de STEC en Estados Unidos son causados por STEC O157 (Valilis *et al.*, 2018). Se estima que cada año se producen más de 265.000 enfermedades por STEC; 96.534 infecciones por STEC O157 y 168.698 por no-O157, además de 3.600 hospitalizaciones y 30 defunciones (Woo y Palavecino, 2013).Por otro lado, existen otros serotipos que han causado casos esporádicos de SHU sin causar brotes, como por ejemplo O113:H21 y O91:H21 (Karmali *et al.*, 2003).

En humanos, STEC presenta un periodo de incubación estimado de 3 a 4 días y la sintomatología varía de 4 a 6 días (Baeza, 2013). Puede causar un rango de cuadros clínicos que van desde una diarrea leve sin complicaciones hasta colitis hemorrágica (CH), Síndrome Hemolítico Urémico (SHU) y púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), cuyos resultados fatales se pueden presentar entre los 5 a 14 días iniciado el cuadro diarreico (Xía *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2013; Baeza, 2013). El SHU se caracteriza por causar hemólisis, consumo de plaquetas y daño renal (Ardissino, 2013) que puede progresar a insuficiencia renal crónica (Murray *et al.*, 2013). Los individuos de todas las edades están en riesgo de contraer STEC, pero los niños menores de 5 años y los ancianos son más propensos a desarrollar SHU, siendo mortal en muchos casos (Xía *et al.*, 2010). El 7,5% de los pacientes menores de un año infectados con STEC desarrollan SHU, presentando una tasa de letalidad entre 3 a 5% (Murray *et al.*, 2013). Entre un 20 y 30% de los sobrevivientes a este síndrome quedan con secuelas de por vida, tales como insuficiencia renal e incluso un 12,5% requieren trasplante (Rivero *et al.*, 2004).

Un estudio publicado en 2014, que evaluó la incidencia global de infecciones y muertes por STEC en humanos, estimó que STEC causa más de 2.8 millones de enfermedades agudas al año, lo que lleva a 3.890 casos de SHU, 270 casos de enfermedad renal en etapa terminal y 230 muertes (Majowicz *et al.* 2014). A nivel mundial Argentina es el país con mayor presentación de SHU en menores de 5 años, con alrededor de 400 casos al año (Padola *et al.*, 2004). En Chile, se lleva un registro de infecciones por STEC gracias al Sistema de Vigilancia de Laboratorios para *E. coli* Verotoxigénico (O157 y otros serogrupos) según el Decreto Supremo 158/2004 (ISP, 2014). En Chile la incidencia de SHU reportada llega a 3,4 casos por 100.000 niños menores de 5 años (Prado y Cavagnaro, 2008). En América Latina, las infecciones por STEC son endémicas y contribuyen a la carga del síndrome diarreico agudo en esta región (Figura 1) (Torres, 2010; Torres, 2016).



(Fuente: Torres, 2010; Torres, 2016)

Figura1. Distribución geográfica de aislamientos y casos de STEC en América Latina. El mapa presenta la distribución pronosticada de aislamientos de STEC en los países latinoamericanos en base a diferentes estudios epidemiológicos.

2.1.2 Factores de virulencia de STEC

Escherichia coli ha evolucionado gracias a la adquisición de genes o factores de virulencia (Keen, 2012). Muchos de estos factores se encuentran codificados en plásmidos, transposones y fagos, capaces de integrarse al genoma de la célula huésped (Keen, 2012). El principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga (Stx), codificada por los genes *stx*. La Stx pertenece a la familia de

las toxinas proteicas. Posee una subunidad A y 5 subunidades B, responsables de la unión al receptor Gb3, o al receptor Gb4 en el caso de la variante Stx2e en cerdos (Etcheverría y Padola, 2013). El receptor Gb3 está presente en varios órganos como el riñón, el cerebro, el hígado y el páncreas. Cuando Stx se une a la célula huésped, la subunidad A se internaliza e inhibe la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. Esto genera un daño irreversible causando la muerte celular (Etcheverría y Padola, 2013). Los principales tipos de Stx son Stx₁ y Stx₂, y estas se clasifican a su vez en 12 subtipos (*Stx_{1a}*, *Stx_{1c}*, *Stx_{1d}*, *Stx_{2a}*, *Stx_{2b}*, *Stx_{2c}*, *Stx_{2d}*, *Stx_{2e}*, *Stx_{2f}*, *Stx_{2g}*, *stx_{2h}* y *stx_{2i}*) (FAO/WHO, 2019). Una cepa de STEC puede producir Stx₁, Stx₂ o ambas toxinas a la vez (Gould, 2013). Estudios epidemiológicos indican que Stx₂ estaría más relacionada a cuadros más graves de la enfermedad y tiene una actividad citotóxica 100 a 1000 veces superior a Stx₁ (Martín y Beutin, 2011). Entre los subtipos de Stx₂, *Stx_{2a}*, *Stx_{2c}* y *Stx_{2d}* se asocian más frecuentemente con el desarrollo de CH y SHU, mientras que *Stx_{2e}*, *Stx_{2f}* y *Stx_{2g}* se consideran menos patogénicos en humanos (Krüger y Lucchesi, 2015; Shen *et al.*, 2015). Por el contrario, cepas de STEC que albergan Stx₁ solo o combinado con Stx₂ tienen menos probabilidades de estar vinculados a pacientes con enfermedad grave (Eklund *et al.*, 2002).

Los tipos de Stx no están distribuidos de forma homogénea. La mayoría de los subtipos Stx se han detectado en cepas de STEC aisladas de ganado bovino, productos cárnicos y en asociación con diferentes animales (Martin y Beutin, 2011; Hofer *et al.*, 2012; Fuente *et al.*, 2015; Krüger y Lucchesi, 2015). Por ejemplo, cepas STEC del subtipo *Stx_{2e}* causan edema en cerdos destetados, con posterior ataxia y muerte, sin embargo, este subtipo no ha sido aislado frecuentemente en casos de SHU (Tseng *et al.*, 2014b; Fasel *et al.*, 2014).

Existen otros factores de virulencia que actúan en distintas etapas de la patogenia de STEC, algunos de ellos incrementando la severidad del cuadro clínico en humanos (Tseng *et al.*, 2014a). Entre estos están los factores de adherencia intestinal en donde destaca el gen *eae*, localizado en la isla de patogenicidad LEE (Locus of enterocyte effacement), la que se requiere para la

formación de la lesión de adhesión y borrado de los enterocitos o A/E (attaching and effacing) (Franzin y Sircili, 2015). Este gen se encuentra con frecuencia en las cepas STEC más virulentas y codifica para la proteína de membrana externa *intimina* (Franzin y Sircili, 2015), involucrada en la colonización bacteriana del epitelio intestinal, generando una serie de cambios a nivel de citoesqueleto celular y causando una lesión tipo A/E (adhesión y borrado) y además determina el contacto cercano y la adherencia entre la bacteria y la célula huésped (Baeza, 2013; Franzin y Sircili, 2015).

Otro gen importante para la patogenicidad de STEC es el gen de la enterohemolisina (*hlyA*), ubicada en plásmidos como el pO157. La enterohemolisina es una exotoxina que forma poros en las membranas celulares de las células blanco (Ristow y Welch, 2016). Su función citolítica contribuye a la patogenia de STEC a través de la lisis de leucocitos, células del túbulo renal y eritrocitos; liberando hierro, el que queda disponible para ser utilizado por la bacteria (Shen *et al.*, 2015; Xía *et al.*, 2010; Baeza, 2013).

II. Biopelículas

2.II.1 Formación de biopelículas de STEC

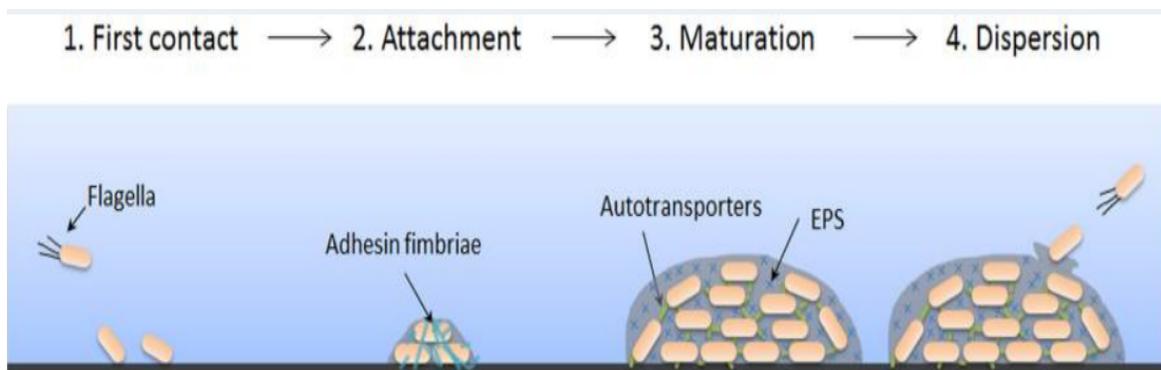
Las biopelículas son comunidades multicelulares de bacterias que se adhieren a superficies abióticas o bióticas y producen una matriz polimérica extracelular (Hurlow *et al.*, 2015). Las biopelículas están formadas hasta en un 97% por agua, además de las células bacterianas y la matriz extracelular (MEC) (Flemming y Wingender, 2010). La matriz está constituida principalmente por exopolisacáridos (EPS), además de macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias. Esta matriz se articula fuera de las células, de forma que protege, estructura y da robustez a toda la comunidad bacteriana (Flemming y Wingender, 2010). Además, las propiedades adhesivas de la MEC permiten que las bacterias permanezcan en la proximidad de la superficie y se adhieran entre sí (White *et al.*, 2003).

La formación de biopelículas involucra al menos cuatro etapas: contacto inicial, adhesión irreversible o apego, maduración y dispersión (Figura 2) (Lavery, *et al.* 2014). El contacto inicial o adhesión reversible involucra el asentamiento a una superficie (Dang y Lovell, 2016). Esta fijación está influenciada por variados factores ambientales, como el pH, la temperatura, las fuerzas atractivas y repulsivas, características de la superficie y también características de la propia bacteria (Tyofuku *et al.*, 2016). En esta etapa el flagelo bacteriano juega un rol importante. Los estudios realizados en la cepa K12 de *E. coli*, que carece de flagelos, han mostrado que ésta no produce biopelículas, por lo que esta motilidad facilitada por flagelos estaría involucrada en la formación de biopelículas en STEC no-O157 (Chen *et al.*, 2013). Luego, el éxito de la etapa de la adhesión irreversible depende de la presencia de adhesinas fimbriales. En esta etapa se forma un contacto íntimo e irreversible entre la bacteria y la superficie (Lavery *et al.*, 2014). En la etapa de maduración, se induce la síntesis de la biopelícula y la bacteria comienza a dividirse generando la MEC. En esta etapa, la biopelícula adopta una estructura tridimensional. En *E. coli*, dos factores son importantes en esta etapa: los exopolisacáridos para la arquitectura de la MEC y los autotransportadores para las interacciones celulares. Los exopolisacáridos son componentes clave de la MEC de la biopelícula (Maunder y Welch, 2017) y estudios han detectado 3 exopolisacáridos en la matriz de biopelículas de *E. coli*: el polímero b-1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA), el ácido colánico y la celulosa. La celulosa es un homopolisacárido producido por algunas bacterias como las de la familia de las Enterobacteriaceae. En *E. coli*, la producción de celulosa está notoriamente correlacionada con la formación de biopelículas y expresión de comportamiento multicelular (morfotipo rdar) (Cimdins y Simm, 2017). El morfotipo rdar es un comportamiento multicelular comúnmente expresado por aislados de *Salmonella entérica* y *Escherichia coli*. El morfotipo rdar media los diferentes tipos de comportamiento multicelular, por ejemplo, la agregación de células en cultivo líquido y la formación de biopelículas en la interfase aire-líquido líquido-sólido (Cimdins y Simm, 2017). Además, este morfotipo es característico de la presencia de celulosa y fimbrias curli, principales determinantes de las interacciones célula-

célula y adherencia celular a superficies abióticas hidrófilas e hidrófobas (Cimdins y Simm, 2017).

Por último, la dispersión es la etapa donde la biopelícula comienza a desprender las bacterias al medio para colonizar nuevas superficies (Kaplan, 2010). Es la etapa menos comprendida en la formación de biopelículas para todas las especies bacterianas y no se ha investigado para STEC (Vogeleer *et al.*, 2014).

La formación de biopelículas se puede dar en cualquier superficie, y representa una estrategia adaptativa de los microorganismos. Algunas ventajas de estas biopelículas son: la protección de los microorganismos ante el tratamiento con desinfectantes y otros agentes antimicrobianos, el incremento de la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, mejora el aprovechamiento del agua reduciendo la posibilidad de deshidratación, y facilita la transferencia de material genético (ADN) (Otter *et al.*, 2014).



(Fuente: Vogeleer *et al.* 2014)

Figura2. Representación esquemática de la formación de biopelículas

2.II.2 Proteínas importantes para la formación de biopelículas en STEC

Las especies bacterianas que contiene la microbiota intestinal requieren del uso de proteínas adhesinas, o alguna combinación de ellas, para acercarse al epitelio, colonizar el intestino del huésped y establecer eventualmente la enfermedad (Stone y Krachler, 2016)

Se sabe que las cepas STEC albergan una gran cantidad de genes que codifican diversas proteínas adhesinas que desempeñan un papel importante en la unión bacteriana y la colonización tanto a superficies abióticas como biológicas. Estas adhesinas contribuyen al establecimiento, la persistencia y el tropismo tisular de STEC (McWilliam y Torres, 2014).

Existen numerosas clases de adhesinas fimbriales que poseen un papel relevante en la interacción bacteria-superficie, dentro de las que destacan en STEC las Fimbrias tipo 1, las cuales son adhesinas filamentosas proteicas expresadas tanto por cepas comensales como patógenas (Berne *et al.*, 2015). Varios estudios han indicado la importancia de estas adhesinas en el desarrollo de biopelículas en superficies abióticas para *E. coli* (Stone y Krachler, 2016). Esta fimbria está codificada por el gen *fimH*. Un estudio realizado por Schembri *et al.* (2003) mostró que la expresión del gen *fimH*, se asociaban a una mayor formación de biopelículas (Schembri *et al.*, 2003). Según un estudio realizado por Pratt y Kolter el 1998, el análisis de la formación de biopelícula en cepas de STEC con *fimH* mutada mostró una drástica disminución de la formación de biopelícula (Pratt y Kolter, 1998). Estos antecedentes muestran que las fimbrias de tipo 1 son críticas para la interacción inicial de bacteria a superficies abióticas como el policloruro de vinilo (PVC) (Florentín *et al.* 2018).

Además, están las Fimbrias curli, o fimbrias delgadas agregadas, que son producidas por Enterobacterias. Estas fimbrias se unen a las proteínas de la matriz extracelular eucarionte (Van Gerven *et al.*, 2018) y son unos de los principales determinantes de las interacciones célula-célula y de la adherencia celular a las superficies hidrofílicas e hidrofóbicas favoreciendo la formación de biopelículas (Van Gerven *et al.*, 2018). Además, la fimbria curli, debido a sus propiedades, puede proteger a las bacterias de los agentes antibacterianos como desinfectantes derivados de amonio cuaternario y el cloro (Wang *et al.* 2012). La producción de la fimbria curli está determinada por dos operones; *csgAB*, que codifica para los genes *csgA* y *csgB* y el gen regulador *crl*, y el operón *csgDEFG* que codifica el regulador transcripcional *csgD* (Beloin *et al.* 2008). Un estudio

realizado por Cookson y colaboradores del 2002 demostró la importancia de la expresión de las fimbrias curli y tipo 1 en la formación de biopelículas de STEC no O157 (Cookson *et al.*, 2002). Los aislados que no expresan los genes para ambas fimbrias pueden presentar adherencia a superficies. Sin embargo, la falta de los genes de la fimbria tipo 1 y curli puede influir negativamente en su capacidad para formar biopelículas maduras y, por lo tanto, colonizar con éxito las superficies abióticas (Cookson *et al.*, 2002)

Además de las proteínas fimbriales, hay un grupo de estructuras expuestas en la superficie que contribuyen a la interacción de STEC. Estas proteínas tienen una estructura que le confiere la capacidad de moverse y secretarse independientemente de la maquinaria de translocación convencional por lo que se denominan autotransportadores (McWilliams y Torres, 2014). Otra de sus funciones es la de conferir adherencia a la matriz extracelular, lo que podría estar asociado a la virulencia de la bacteria (Buvens y Pierard, 2012). En STEC se han identificado genes autotransportadores como *ehaA*, *ehaB*, *flu*, *cah* y *espP* que estarían involucrados en la maduración de biopelículas de STEC (Biscola *et al.*, 2011; Vogeleer *et al.*, 2016). En estudios realizados en STEC, se han identificado que las proteínas autotransportadoras EhaA, EhaB y EhaJ están implicadas en la unión a superficies bióticas y abióticas, y entre estas, EhaA y EhaB han sido observados como los más prevalentes entre las cepas STEC (Polifroni *et al.*, 2012; Etcheverría y Padola, 2013). En un estudio, tras la expresión de *ehaA* incorporada a una cepa no virulenta de *E. coli*, esta pudo inducir la agregación celular (Wells *et al.*, 2008). Otro estudio mostró que la expresión del gen *ehaB* en *E. coli* K-12 mutada fue capaz de interactuar con las proteínas de la MEC confirmando la capacidad de formar biopelícula (Wells *et al.*, 2009).

En STEC y en otras cepas de *E. coli*, se encuentra también el antígeno 43 (Ag43), un autotransportador codificado por el gen *flu* y que causa interacciones célula-células muy cercanas. El gen *flu* se induce específicamente durante el crecimiento de la biopelícula y su expresión aumenta la formación de biopelícula en *E. coli* (Ulett *et al.*, 2006). EspP es una de las proteínas serina proteasa más

abundantes en los sobrenadantes de cultivo de cepas de STEC (Brockmeyer *et al.*, 2009). Por último, el autotransportador Cah, antígeno de unión a calcio homólogo a Ag43, que junto con EspP, son proteínas en que la expresión de sus genes *cah* y *espP* respectivamente, se ha asociado con la adhesión y formación de biopelículas en STEC (Biscola *et al.*, 2011; Vogeleeer *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). En un estudio del 2010, la adición de *espP* provocó la restauración del fenotipo adhesivo de la cepa mutante *espP* (Xicohtencatl *et al.*, 2010). En el estudio realizado por Torres *et al.* (2002), las cepas que contenían una mutación simple o doble en los genes *cah*, no mostraron ninguna diferencia en la formación de biopelículas en comparación con la cepa silvestre (Torres *et al.*, 2002).

Si bien todas estas proteínas se han estudiado en diversos grados, todas las adhesinas resumidas en este estudio son las más ampliamente descritas en aislados STEC y se han relacionado con diferentes etapas de la formación de biopelículas de la bacteria.

2.II.3 La industria alimentaria y las biopelículas

Una de las principales preocupaciones para la industria de los alimentos es producir alimentos inocuos. En la mayoría de las plantas procesadoras de alimentos, las principales zonas que tienen contacto directo con los alimentos son limpiadas y sanitizadas diariamente, sin embargo, existen zonas que se limpian precariamente o no se limpian. Esto genera una oportunidad para que se formen biopelículas (Navia *et al.*, 2010) y a través de ellas se contaminen los alimentos. La prevalencia de estas películas sobre las superficies en donde se manejan o almacenan alimentos representa un riesgo de contaminación latente (Tellez, 2010). Las consecuencias de la formación de biopelículas en la industria de los alimentos se asocian a potenciales pérdidas económicas, ya sea por decomiso, deterioro de los alimentos, entre otros. Además, el desarrollo de biopelículas puede interferir y causar daños en los equipos, en sistemas de agua potable, obstruir las cañerías o filtros de membranas en plantas procesadoras de alimento (Zhao, 2016). La prevalencia de estas biopelículas sobre las superficies en donde se procesan o almacenan alimentos representa un riesgo de contaminación

latente y un evidente riesgo para la salud humana, además de representar un desafío permanente en la industria de los alimentos (Vogeleer *et al.*, 2014). Existe mucha información y ha sido bien documentado la presencia de STEC en las plantas procesadoras de carne y alimentos. Estos estudios han sugerido que la capacidad de STEC de formar biopelículas en diferentes superficies es responsable de la distribución y persistencia de la bacteria en este tipo de plantas (Aslam *et al.*, 2004; Rivera-Betancourt *et al.*, 2004).

En la industria de alimentos, el acero inoxidable (AI) es el material más utilizado, ya que es resistente a la corrosión y a los golpes, dura un prolongado tiempo, es de fácil limpieza y su fabricación es sencilla (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2019). Sin embargo, a nivel microscópico, el AI presenta pequeñísimas grietas en su superficie que permitirían una mayor retención de bacterias por el aumento del número de puntos de adhesión (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2019).

Por otro lado, la contaminación ambiental de STEC por las heces de animales portadores también es una continua preocupación para la salud pública y la inocuidad alimentaria. STEC puede sobrevivir prolongados periodos de tiempo en el ambiente y las biopelículas son el factor al que se le atribuye esta supervivencia especialmente en predios agrícolas, ríos y plantas de procesamiento (Vogeleer *et al.*, 2014). En las plantas de procesamiento de alimentos, la contaminación de productos como la carne se puede producir en diferentes etapas y por lo general se debe a la formación de biopelículas de STEC que se ubican en las superficies de los equipos y máquinas (Vogeleer *et al.*, 2014). La resistencia a varios desinfectantes sustenta la idea de que las biopelículas de STEC crecen y contaminan el alimento en las plantas de procesamiento (Wang *et al.*, 2012).

2.II.4 Estudios en biopelículas de STEC

Estudios afirman que cepas de *E. coli*O157:H7 pueden desarrollar biopelículas como resultado de producción de exopolisacáridos y fimbria curli (Ravva *et al.*, 2016). La expresión de fimbrias curli en algunas cepas de

STEC se ha asociado con la formación de biopelículas en superficies de poliestireno (PS) y Al (Park y Chen, 2015). También se ha demostrado que las biopelículas le confieren, a aislados de *E. coli* O157:H7, una mayor resistencia a desinfectantes como el hipoclorito de sodio, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (Bridier *et al.*, 2011). Esto se condice con estudios que han afirmado que la expresión de fimbrias curli pueden proteger a las bacterias de agentes antimicrobianos como por ejemplo el cloro o el amonio cuaternario (Wang *et al.*, 2012). Este estudio refleja la importancia que tendrían algunos genes asociados a formación de biopelícula en la persistencia de la bacteria en las plantas de procesamiento de carnes, provocando la contaminación de carne que podría venir inocua.

Además, un estudio realizado por Wang *et al.* (2016) en STEC no-O157 aislada desde distintos hospederos (humanos, ovinos y bovinos) mostró que un 67% (24/36) de las cepas formaron biopelículas moderadas y fuertes; y de estas, el serotipo O113 fue que tuvo mayor capacidad de formación. Además, de las cepas formadoras de biopelículas, el 100% presentó los genes *fimH*, *csgA*, *crl* y *csgD*. En otro estudio, Vogeleer *et al.* (2016) describió que el 64% (25/39) de STEC causantes de enfermedad humana formaron biopelículas, y que el 95% (37/39) de estos aislados resultaron positivos a la producción de fimbria curli. Además, en este estudio se observó una asociación entre la presencia del gen fimbrial Z1538 (fimbria tipo 1), los genes autotransportadores *ehaB*, *espP* y la formación de biopelículas. En resumen, el estudio mostró que los aislados positivos a los genes asociados a biopelícula fueron capaces de formar significativamente más biopelícula que los aislados sin ellos.

Biscola *et al.* (2011) realizó un ensayo con 51 cepas STEC aisladas desde humanos, animales, alimento y agua, y las clasificó en O157 (18) y no-O157 (33). Este estudio mostró que un 59% (30) del total de cepas formaron biopelícula. El 66,7% (22/33) de las cepas no-O157 fueron formadoras de biopelículas y el 44,4% (8/18) de las O157 formaron biopelículas. Dentro de las formadoras de biopelículas, el 97% (29/30), 50% (15/30), 37% (11/30) y 87% (26/30) fueron

positivos a *fimH*, *flu*, *cah*, *ehaA* respectivamente por PCR. El 100% (51/51) de las cepas en el estudio presentó los genes *csgA* y *crl*.

2.II.5 Rol de las biopelículas en la sobrevivencia de STEC en el ambiente

STEC puede sobrevivir prolongados periodos de tiempo en el ambiente y las biopelículas son el factor al que se le atribuye esta supervivencia (Vogeleer *et al.*, 2014). En las plantas de procesamiento de alimentos, la contaminación de productos como la carne se puede producir en diferentes etapas y por lo general se debe a la formación de biopelículas de STEC que se ubican en diferentes tipos de superficies (Vogeleer *et al.*, 2014). Estudios sobre la presencia de STEC en plantas procesadoras de carne sugieren que su capacidad de formar biopelículas en diferentes superficies es responsable de la distribución y persistencia de la bacteria en este tipo de plantas (Fouladkhah *et al.*, 2013).

Si bien, la temperatura optima de multiplicación de *E. coli* es de 37°C, la bacteria es capaz de adaptarse a temperaturas inferiores y superiores en el rango de 7°C a 50°C, lo que se traduce en un serio problema en los establecimientos médicos, industria alimentaria y en el hogar (Farrokh *et al.*, 2013). En el entorno de la planta de procesamiento, las temperaturas normalmente se controlan y mantienen entre 4°C y 15° C como forma de conservación de los alimentos ya que éstas disminuyen la tasa de proliferación bacteriana (Dourou *et al.*, 2011). A pesar de esto, varios estudios demuestran que STEC es capaz de formar biopelículas dentro de este rango de temperatura (Fouladkhah *et al.*, 2013). Un estudio realizado por White-Ziegler *et al.* (2008) en aislados STEC demostró que hubo una mayor formación de biopelículas y mayor expresión de genes asociados a la formación de biopelículas a 23°C (temperatura ambiente) que a 37°C (temperatura optima de multiplicación de la bacteria) (White-Ziegler *et al.*, 2008). En las plantas de procesamiento de carne, a pesar de las medidas de control, la bacteria se encuentra presente contaminando los productos cárnicos. Esta persistencia de STEC en los productos cárnicos hace pensar que las cepas que contaminan la

carne pudiesen tener una mayor capacidad de formación de biopelículas y tener mayores posibilidades de llegar al consumidor.

La carne molida es un producto cárnico que pasa por una serie de procesos y es de alta manipulación tanto desde el faenamiento del animal, como en las plantas de procesamiento, presentando varios puntos críticos de posible contaminación debido a la constante manipulación y la diversidad de condiciones ambientales a la que la carne está expuesta (Wang *et al.*, 2012). Estas etapas, sumadas condiciones estresantes, nos muestran un medio hostil en que la bacteria no debiera persistir (Strus, 1997; Fijan y Sostar-Turk, 2010). Sin embargo, y gracias a la formación de biopelículas en las superficies, muchas veces logra llegar al consumidor, provocando la enfermedad.

Los antecedentes expuestos plantean la importancia potencial de algunos genes fimbriales y autotransportadores en la formación de biopelículas en STEC y en las diferentes capacidades que tiene STEC de formar biopelículas en distintos entornos. El presente estudio pretende caracterizar la capacidad de formar biopelículas de aislados de STEC de dos orígenes diferentes—carne molida y heces de bovino— y determinar la asociación entre la formación de biopelícula con la presencia de genes fimbriales y autotransportadores. Esto podría ayudar a entender el comportamiento de la bacteria en el entorno y brindar un mejor entendimiento de las biopelículas de STEC.

3 Hipótesis

Los aislados de *Escherichia coli* Productoras de Toxina Shiga (STEC) provenientes de muestras de carne molida tienen una capacidad significativamente mayor de formar biopelículas que los aislados STEC de muestras de heces de bovino.

La presencia de genes fimbriales y autotransportadores está directamente asociada a la capacidad de formar biopelículas de los aislados STEC.

4 Objetivo general

Determinar la capacidad de formar biopelículas y su asociación con determinantes genéticos asociados a la formación de biopelículas en aislados STEC de carne molida y heces de bovino.

I. Objetivos específicos

1. Caracterizar genotípicamente aislados STEC obtenidos desde carne molida y heces de bovino.
2. Determinar la capacidad de formación de biopelículas de aislados STEC de carne molida y heces de bovino.
3. Analizar la asociación entre la presencia de determinantes genéticos fimbriales y autotransportadores, y sus polimorfismos, con la formación de biopelículas en aislados STEC de carne molida y heces de bovino.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos fueron realizados en las dependencias del Laboratorio de Microbiología y Probióticos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA).

I. **Objetivo 1. Caracterizar genotípicamente aislados STEC obtenidos desde carne molida y heces de bovino.**

En este objetivo se confirmó que los aislados fueran STEC, mediante PCR para el gen *uspA* de *E. coli* y luego se caracterizó las cepas STEC basado en la determinación de la presencia de los principales factores de virulencia de STEC: *stx₁*, *stx₂*, *eae* y *hlyA*.

5.I.1 Aislados bacterianos y ADN control

- **Aislados:** Se trabajó con un total de 186 aislados de *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga (STEC), incluyendo 69 de carne molida y 117 de heces de bovino (Tabla 1). Los aislados corresponden a STEC aisladas en el proyecto FONDECYT 11150491. Los aislados se confirmaron como STEC a través de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para *E. coli*, y se determinó la presencia de los genes *stx₁*, *stx₂*, *eae* y *hlyA*.
- **Controles de ADN:** La cepa ATCC 35150 se utilizó como control positivo para *E. coli*, así como para los genes *stx₁*, *stx₂*, *eae* y *hlyA*.

5.I.2 Extracción de ADN desde aislados

Para la extracción de ADN desde los aislados puros, se sembró una asada del material desde el tubo de cepario almacenado a -80°C en placas de agar Tripticasa de Soya (TSA), y se incubó a 37°C por 24 horas. Luego, se tomó 3-4 colonias individuales y se suspendió en 1 ml de suero fisiológico. Se realizó un lavado con suero fisiológico y se extrajo ADN por hervido (100°C por 10 min). Finalmente, el ADN se almacenó a -20°C hasta su análisis posterior.

5.1.3 Confirmación de especie a través de PCR

Los aislados se confirmaron como *Escherichia coli* a través de una prueba de PCR con partidores derivados de las secuencias del gen que codifica para la proteína de estrés universal *uspA* (Chen y Griffiths 1998). La reacción de PCR incluyó 0,3 µM de cada uno de los partidores *E.coli* (Cuadro 1) ,10 µL de MastermixGoTaq (GoTaq® Green Master mix, 2X, Promega; Madison Wisconsin, EEUU) ,5 µL de agua libre de nucleasa y 1µL de ADN de muestra para una reacción final de 17 µL.

Tabla 1. Partidores para PCR *E. coli*

| Partidor | Gen | Secuencia | T° alineamiento | Tamaño producto de PCR (pb) | Referencia |
|-----------|-------------|------------------------------|--------------------|--------------------------------------|------------|
| E. coli F | <i>uspA</i> | (5 –CCGATACGCTGCCAATCAGT– 3) | 58°C | 884 | Chen, 1998 |
| E. coli R | | (5 –ACGCAGACCGTAGGCCAGAT– 3) | | | |

5.1.4 Caracterización genotípica: presencia de factores de virulencia *stx*_{1,2}, *stx*₂, *hlyA* y *eae*.

Para caracterizar genotípicamente los aislados, se identificó la presencia de genes *stx*₁ y *stx*₂ mediante PCR múltiple, y los genes *eae* y *hlyA* por PCR convencional, bajo las condiciones que se detallan a continuación:

5.1.4.1 PCR genes *stx*₁- *stx*₂

El PCR múltiple se realizó en una mezcla de reacción en un volumen final 10 µL. Ésta contendía 5µL de MastermixGoTaq (GoTaq® Green Master mix 2X), 0.2µM de cada uno de los partidores (*stx*₁ y *stx*₂)(Cuadro 2), 3.6 µL de agua libre de nucleasa y 1 µL de DNA de la muestra a evaluar (Cebula *et al.*, 1995).

5.1.4.2 PCR *eae*

Se realizó un PCR para detectar la presencia del gen de la intimina (*eae*) en las cepas de STEC aisladas. La mezcla de reacción constó de un volumen final de 17 μ L; 10 μ L de MastermixGoTaq (GoTaq® Green Master mix 2X), 0.3 μ M de cada partidor *eae* (cuadro 2), 5 μ L de agua libre de nucleasa y 1 μ L de ADN (Fratamico y Strobaught, 1998).

5.1.4.3 PCR *hlyA*

Se realizó un PCR para detectar la presencia del gen hemolisina (*hlyA*) en una reacción de 17 μ L el que incluyó 10 μ L de MastermixGoTaq (GoTaq® Green Master mix 2X), 0.3 μ M de cada uno de los partidores (Cuadro 2), 5 μ L de agua libre de nucleasa y 1 μ L de ADN de la muestra evaluada (Xia *et al*, 2010).

Tabla 2. Partidores para PCR de factores de virulencia *stx*₁, *stx*₂, *eae* y *hlyA*.

| Partidor | Gen | Secuencia | T° Alineamiento | Tamaño producto de PCR (pb) | Referencia |
|----------|-------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Stx1 F | <i>stx1</i> | (5 –CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG– 3) | 59°C | 348 | Cebula <i>et al.</i> (1995) |
| Stx1 R | | (5 –CACCAGACAATGTAACCGCTG– 3) | | | |
| Stx2 F | <i>stx2</i> | (5 –ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG– 3) | 59°C | 584 | Cebula <i>et al.</i> (1995) |
| Stx2 R | | (5 –GCGTCATCGTATACACAGGAGC– 3) | | | |
| eae F | <i>eae</i> | (5 –ATTTACCATCCACACAGACGGT– 3) | 63°C | 397 | Fratamico y Strobaught (1998) |
| eae R | | (5 –ACAGCGTGGTTGGATCAACCT– 3) | | | |
| hlyA F | <i>hlyA</i> | (5 –AGCCGGAACAGTTCTCTCAG– 3) | 58°C | 526 | Xía <i>et al.</i> (2010) |
| hlyA R | | (5 –CCAGCATAACAGCCGATGT– 3) | | | |

Para determinar la presencia y el tamaño de los productos de PCR, el resultado de la reacción de PCR se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa a una concentración entre 1% a 2% según el tamaño de banda esperado para cada reacción. Las condiciones de corrida del gel fueron 100 volts por 25min.

5.1.5 Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos fueron organizados utilizando el programa Microsoft Office Excel 2007, con el cual se ordenaron y sintetizaron los datos para establecer perfiles genéticos de acuerdo con la presencia de genes de virulencia descritos.

II. Objetivo 2. Determinar la capacidad de formación de biopelículas de aislados STEC de carne molida y heces de bovino.

En este objetivo se determinó la capacidad de cada aislado para formar biopelículas en placas de poliestireno.

5.II.1 Selección de aislados

Con los resultados obtenidos del objetivo 1 se seleccionaron los aislados STEC con los que se continuó en el objetivo 2 y 3. Para esto se tabularon los resultados del objetivo 1 según la presencia/ausencia de cada gen de virulencia (*stx*₁, *stx*₂, *eae*, *hlyA*) formando perfiles genéticos, y a partir de estos perfiles se seleccionaron aislados representativo de cada perfil bacteriano. Se tuvo en cuenta y se verificó que los aislados de los perfiles genéticos que se seleccionaron estaban representados equitativamente para ambos orígenes (carne molida y heces de bovino).

5.II.2 Ensayo de formación de biopelícula

El objetivo de este ensayo fue observar la capacidad de desarrollo biopelículas de los aislados STEC a 23°C (Temperatura ambiente) y a 37°C y cuantificar esta formación. Para esto se utilizaron los aislados seleccionados y se evaluó la formación de biopelículas en microplacas de poliestireno de 96 pocillos según el método descrito por Biscola *et al.* (2011) con algunas modificaciones.

Del tubo de cada aislado se tomó una asada y se sembró por estría en Placas de agar McConckey (MAC) y se cultivó *Overnight* (ON) a 37°C. Luego, se tomó una colonia característica de *E. coli* y se pasó a caldo Luria Bertani (LB) y se

incubó a 37°C por 18-24 hrs. Luego, se ajustó la densidad óptica (OD) de los cultivos a $OD_{600nm} = 0,5$ y se añadió 200 μ L de suspensión celular a cada pocillo de la placa de PS. Cada placa contuvo replicas técnicas, por lo que tres pocillos de cada placa tuvieron el mismo aislado. Las microplacas se incubaron a 23° C durante 72 horas y a 37°C por 24 horas. Después de la incubación, se eliminó el sobrenadante de los pocillos y las placas se lavaron 3 veces agregando 200 μ L de agua destilada a cada pocillo. Las bacterias que aún estaban adheridas a la placa se fijaron con 250 μ l de metanol por pocillo durante 15 min. Las placas se vaciaron y se dejaron secar al aire por 10 min. y luego se tiñeron con 200 μ L de solución de cristal violeta al 1% (p/v) durante 15 minutos, seguidas de tres lavados con 200 μ L de agua destilada. Finalmente, el colorante unido a la biopelícula se disolvió con etanol al 95%.

5.II.2.1 Cuantificación de biopelículas

La cuantificación de biopelículas se realizó mediante el método colorimétrico de microtitulación en placa, basado en la medición de la absorbancia de la biopelícula teñida con cristal violeta, con una densidad óptica de 620nm.

Los aislados fueron agrupados en cuatro categorías según la densidad óptica de corte (ODc) (cuadro 3). Esta OD de corte se estableció con las OD obtenidas de los pocillos blanco (LB sin sembrar) con el fin de corregir las densidades ópticas de las cepas eliminando lo correspondiente al colorante absorbido por el medio y la superficie y de este modo conocer lo que realmente corresponde a la formación de la biopelícula de cada aislado (Gómez *et al.*, 2013).

Tabla 3. Categorías de formación de biopelículas según Densidad Óptica (DO)

| | |
|--|--|
| NFB (No formadora de Biopelícula) | DO cepa \leq DOc |
| DFB (Débil Formadora de Biopelícula) | DOc \leq DO cepa \leq 2 x DOc |
| MFB (Moderada Formadora de Biopelícula) | 2 x DOc \leq DO cepa $<$ 4 x DOc |
| FFB (Fuerte Formadora de Biopelícula) | DO cepa $>$ 4 x DOc |

DOc: Densidad Óptica de corte, control negativo

(Gómez *et al.*, 2013).

5.II.3 Análisis de los resultados

- Para determinar la asociación entre la categoría de formación de biopelícula y origen del aislado (heces de bovino y carne molida) se realizó una prueba de **Chi cuadrado (χ^2)**.

Los resultados obtenidos fueron analizados empleando el programa Sigma Stat Statistical Software (IBM SPSS Statistics 22.0)

III. Objetivo 3. Analizar la asociación entre la presencia de determinantes genéticos fimbriales y autotransportadores, y sus polimorfismos, con la formación de biopelículas en aislados STEC de carne molida y heces de bovino.

En este objetivo se determinó si existe relación entre la presencia de genes asociados a biopelículas y sus posibles polimorfismos, con la capacidad de formar biopelículas de los aislados.

5.III.1 Secuenciación del genoma completo de aislados STEC

Para realizar la búsqueda de los genes asociados a biopelículas de STEC se utilizaron los datos obtenidos a partir de la secuenciación del genoma completo de los aislados STEC de bovino y carne molida incluidos en este estudio.

La extracción del DNA para secuenciación del genoma completo se realizó utilizando el kit comercial *DNeasy® Blood&Tissue Kit* de QIAGEN en el laboratorio de microbiología y probióticos del INTA. El DNA fue enviado a Estados Unidos para la secuenciación de los genomas en el laboratorio de Inocuidad de los Alimentos del Departamento de Nutrición y Alimentos de la Universidad de Maryland, Estados Unidos. Para la secuenciación, se empleó la tecnología Miseq de Illumina® con lecturas *paired-end* con fragmentos de 250 pb. La construcción de la librería se realizó con Nextera-XT Library Prep Kit. Las lecturas (*reads*) obtenidas del secuenciador fueron ensambladas *de novo* usando el programa *CLC genomics work bench*, con un tamaño mínimo de contig de 500 pb.

5.III.2 Identificación de genes asociados a formación de biopelículas

La identificación de los genes asociados a formación de biopelículas de STEC se realizó mediante un alineamiento, donde se hizo la búsqueda de la homología de las secuencias de los genes asociados a formación de biopelículas con el genoma secuenciado de los aislados STEC, esto mediante herramientas

computacionales. Este análisis se realizó en la plataforma bioinformática Geneious Version11.0.3 (Biomatters, Nueva Zelanda).

Se utilizaron las secuencias de los genes de referencias obtenidas del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) para los genes, específicos y definidos, asociados a la formación de biopelícula: *csgA*, *csgD*, *crl*, *fimH*, *fimA*, *ehaA*, *ehaB*, *cah*, *flu* y *espP* (Maurer *et al.*, 1998; Makino *et al.*, 1998; Henderson y Owen, 1999; Johnson y Stell, 2000; Restieri *et al.*, 2007; Wells *et al.*, 2008; Ogasawara *et al.*, 2010). Las secuencias de referencia se alinearon para crear una secuencia consenso con la que se realizó una búsqueda en el genoma a través de la aplicación *Map to Reference* (Geneious v11.0.3). Esta aplicación permitió identificar la zona del genoma en la que el gen de consenso se alinea y estaría ubicado, y se determinó la presencia o ausencia del gen en el genoma. Además, se rescató la secuencia del gen desde cada genoma y se comparó sus secuencias a través de alineamiento múltiple (Geneious v11.0.3), para verificar si la secuencia del gen es conservada o no entre los genomas de STEC aisladas en Chile.

5.III.3 Análisis de los resultados

Para estudiar si existió una asociación entre la presencia de los genes asociados a biopelículas en cada aislado STEC y la formación de biopelícula se estimó una correlación mediante el coeficiente de Spearman, ρ (rho). Con este análisis se midió el grado de correspondencia entre los rangos de las variables analizadas (formación de biopelículas y presencia de genes) de cada uno de los aislados. Este análisis se realizó por cada gen y nos permitió observar como la presencia del gen asociado a la formación de biopelículas se relaciona a la capacidad de formar biopelículas de los aislados en las microplacas de PS. Además, se describió la presencia de diferentes alelos aminoacídicos para cada uno de los genes en estudio y se determinó si existe asociación entre alguno de estos alelos y la formación de biopelículas de los aislado STEC mediante el coeficiente de Spearman, ρ (rho).

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{N(N^2 - 1)}$$

- Solamente toma en cuenta valores entre 1 y -1.
- El 0 indica que no existe correlación.
- El valor numérico indica la magnitud de la correlación.

Los resultados obtenidos fueron analizados empleando el programa Sigma Stat Statistical Software (IBM SPSS Statistics 22.0).

6 RESULTADOS

I. Objetivo 1. Caracterizar genótipicamente aislados STEC obtenidos desde carne molida y heces de bovino.

Se evaluaron 186 aislados de STEC: 69 provenientes de carne molida y 117 de heces de bovino (Figura 1). Del total, 63% (117/186) fueron positivas solo al gen *stx*₂, seguido de aislados que portaban tanto *stx*₁ como *stx*₂ (21%; 39/186) y finalmente, 16% (30/186) fueron positivas sólo al gen *stx*₁.

Con respecto a la presencia de los genes *eae* y *hlyA*, 38,7% (72/186) de los aislados resultaron positivos al gen de la enterohemolisina (*hlyA*) y solo un aislado (0,5%; 1/186) fue positivo al gen de la intimina (*eae*). Este aislado provino de las muestras de heces de bovino (Figura 1). La presencia de los genes de virulencia *stx*₁, *hlyA* y *eae* resultó ser independiente del origen de los aislados STEC ($p > 0,05$). Sin embargo, la presencia del gen *stx*₂ resultó ser dependiente del origen del aislado STEC, mostrando diferencias significativas en el análisis ($p = 0,044$).

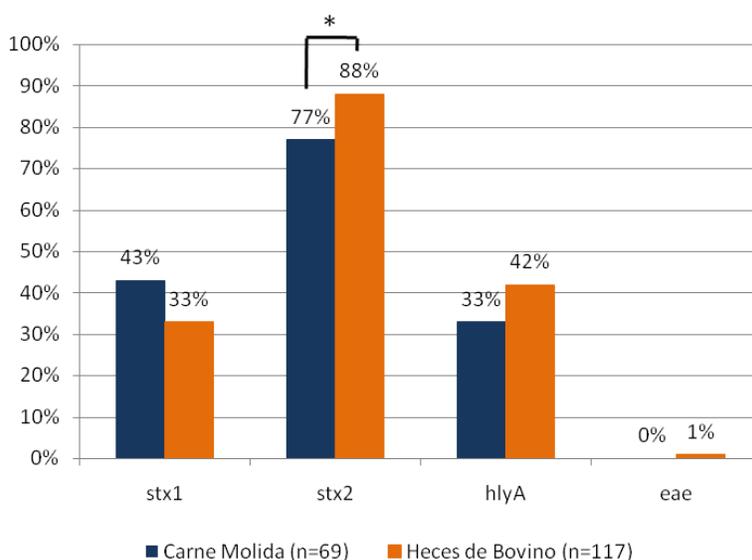


Figura3. Frecuencia de genes de virulencia *stx*₁, *stx*₂, *hlyA* y *eae* en los aislados de carne molida (n=69) y heces de bovino (n=117).

*, Representa diferencias significativas entre los orígenes de aislamiento.

Con la información obtenida de la caracterización de los aislados según la presencia de genes de virulencia, se crearon perfiles de virulencia conformados por presencia/ausencia de cada uno de los genes estudiados (*stx1*, *stx2*, *hlyA* y *eae*). Se observó que los 117 aislados STEC de heces, los que provenían originalmente de 66 muestras de heces de bovino, se agruparon en 7 perfiles de virulencia. La mayoría de los aislados se agruparon en dos perfiles principales (Tabla 4); el perfil predominante se caracterizó por la presencia del gen *stx*₂ como único gen de virulencia (40%; 47/117), seguido por aislados que presentaron solo los genes *stx*₂ y *hlyA* (27%; 31/117) (Tabla 4).

En el caso de los 69 aislados STEC de carne molida, los que provenían originalmente de 43 muestras, se presentaron 6 perfiles distintos. De manera similar a lo observado en las muestras de bovino, el perfil predominante incluyó a aislados que portaban solo el gen *stx*₂ (39%; 27/69) (Tabla 4).

Tabla 4. *Perfiles genotípicos de aislados de heces de bovino y carne molida.*

| Perfiles | Heces de Bovino | Carne Molida | Total |
|--|-------------------|------------------|-------------------|
| | n (%) | n (%) | |
| <i>stx</i>₂ | 47 (40%) | 27 (39%) | 74 (40%) |
| <i>stx</i>₁ | 8 (7%) | 10 (15%) | 18 (10%) |
| <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂ | 11 (9%) | 9 (13%) | 20 (11%) |
| <i>stx</i>₂, <i>hlyA</i> | 31 (27%) | 12 (17%) | 43 (23%) |
| <i>stx</i>₁, <i>hlyA</i> | 6 (5%) | 6 (9%) | 12 (6%) |
| <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂, <i>hlyA</i> | 13 (11%) | 5 (7%) | 18 (10%) |
| <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂, <i>hlyA</i>, <i>eae</i> | 1 (1%) | 0 (0%) | 1 (1%) |
| Total | 117 (100%) | 69 (100%) | 186 (100%) |

Con esta información se seleccionaron 67 aislados representativos de la diversidad de aislados en el estudio: 37 aislados de bovino y 30 de carne molida (Tabla 5).

Tabla 5. *Número de aislados seleccionados según perfil de virulencia.*

| Perfiles | HECES DE BOVINO | | CARNE MOLIDA | |
|--|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|
| | Aislados totales | Aislados seleccionados | Aislados totales | Aislados seleccionados |
| <i>stx</i>₂ | 47 | 6 | 27 | 10 |
| <i>stx</i>₁ | 31 | 16 | 12 | 10 |
| <i>stx</i>₂, <i>hlyA</i> | 6 | 2 | 10 | 2 |
| <i>stx</i>₁, <i>hlyA</i> | 8 | 1 | 6 | 2 |
| <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂ | 11 | 2 | 9 | 2 |
| <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂, <i>hlyA</i> | 13 | 9 | 5 | 4 |
| <i>stx</i>₁, <i>stx</i>₂, <i>hlyA</i>, <i>eae</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Total | 117 | 37 | 69 | 30 |

II. Objetivo 2. Determinar la capacidad de formación de biopelículas de aislados STEC de carne molida y heces de bovino.

6.II.1 Detección y cuantificación de la formación de biopelícula en aislados STEC

La formación de biopelículas de los 67 aislados seleccionados en el objetivo 1 fue evaluada a través de ensayos en microplacas de PS de 96 pocillos con el método de tinción con cristal violeta y bajo dos condiciones; 23°C por 72 horas y 37°C por 24 horas. Para evaluar la formación de biopelículas, se cuantificó la biomasa de la biopelícula formada en cada pocillo y se obtuvieron promedios a

partir de cada replica y para cada aislado. Los experimentos se realizaron en triplicado.

Luego de teñirlos cultivos con cristal violeta, se midió la absorbancia (DO_{620}) de las biopelículas formadas. Los valores obtenidos (promedios de los triplicados) fueron clasificados según la DOc (densidad óptica promedio alcanzada por los pocillos control negativo de cada lectura). Los valores obtenidos fueron distribuidos en categorías para clasificar semi-cuantitativamente la capacidad de formación de biopelícula en cuatro categorías: Fuerte (F), Moderada (M), Débil (D) y No formadora (NF) (Tabla 6).

Tabla 6. *Categorías de formación de biopelículas según Densidad Óptica (DO)*

| | |
|--|--|
| NFB (No formadora de Biopelícula) | DO cepa \leq DOc |
| DFB (Débil Formadora de Biopelícula) | DOc \leq DO cepa \leq 2 x DOc |
| MFB (Moderada Formadora de Biopelícula) | 2 x DOc \leq DO cepa $<$ 4 x DOc |
| FFB (Fuerte Formadora de Biopelícula) | DO cepa $>$ 4 x DOc |

DOc: Densidad Óptica de corte, control negativo

(Gómez *et al.*, 2013).

6.II.2 Caracterización de la capacidad de STEC de formar biopelículas

El 82% de los aislados cultivados a 23°C fueron capaces de formar biopelículas sobre placas de PS. En el ensayo a 37°C, 66% de los aislados formaron biopelículas. Solo cuatro aislados STEC no formaron biopelícula a ninguna temperatura: una proveniente de carne molida y tres de heces de bovino. A 23°C, el mayor porcentaje de aislados formó biopelícula moderada o fuerte

(60%; 40/67; Tabla 7). Por otro lado, en los ensayos a 37°C, el mayor porcentaje de aislados formaron biopelícula débil (64%; 43/67; Tabla 8).

Los aislados de carne molida formaron, en su mayoría, biopelículas fuertes a 23°C (37%; 11/30; tabla 7). Sin embargo, a 37°C, la mayor parte de los aislados no formó biopelículas (60%; 18/30; Tabla 8). En cuanto a los aislados de heces de bovino, el mayor porcentaje correspondió a aislados con moderada capacidad de formación de biopelícula a 23°C (30%, 11/37; Tabla 7). Por el contrario, el 84% (31/37) de los aislados de heces de bovino formaron biopelículas débiles a 37°C (Tabla 8).

A pesar de estos resultados, la producción de biopelículas a 23 °C resultó ser independiente del origen STEC ($p > 0,05$). Sin embargo, a 37°C, donde la mayoría de los aislados de carne molida no formaron biopelículas (60%; 18/30) y la mayoría de los aislados de heces de bovino formaron biopelícula débil (46%, 31/67), si se detectaron diferencias significativas entre la capacidad de formar biopelícula en función del origen de los aislados ($p = 0,00$).

Tabla 7. *Categorización de los aislados STEC de acuerdo a su capacidad de formar biopelículas a 23°C.*

| Origen STEC | Formación de Biopelículas 23°C | | | |
|------------------------|--------------------------------|----------|----------|----------|
| | NF | D | M | F |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| Carne Molida | 2 (7%) | 8 (27%) | 9 (30%) | 11 (37%) |
| Heces de bovino | 10 (27%) | 7 (19%) | 11 (30%) | 9 (24%) |
| Total | 12 (18%) | 15 (22%) | 20 (30%) | 20 (30%) |

NF: No Formadoras; D: Débiles; M: Moderadas; F: Fuertes.

Tabla 8. Categorización de los aislados STEC de acuerdo a su capacidad de formar biopelículas a 37°C.

| Origen STEC | Formación de Biopelículas 37°C | | | |
|------------------------|--------------------------------|----------|--------|--------|
| | NF | D | M | F |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| Carne Molida | 18 (60%) | 12 (40%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Heces de bovino | 5 (13%) | 31 (84%) | 1 (3%) | 0 (0%) |
| Total | 23 (34%) | 43 (64%) | 1 (2%) | 0 (0%) |

NF: No Formadoras; D: Débiles; M: Moderadas; F: Fuertes.

III. Objetivo 3. Analizar la asociación entre la presencia de determinantes genéticos fimbriales y autotransportadores, y sus polimorfismos, con la formación de biopelículas en aislados STEC de carne molida y heces de bovino.

6.III.1 Identificación de genes asociados a formación de biopelículas

Se exploró las secuencias genómicas de los 67 aislados STEC de carne molida y heces de bovino. Cada uno de los genes fue identificado en al menos un aislado.

En la tabla 9 se muestra la prevalencia de los genes fimbriales y autotrasportadores en los 67 aislados de carne molida y heces de bovino. Los genes fimbriales estuvieron presentes en el 100% de los aislados provenientes de carne molida. El porcentaje de los aislados que presentaron genes fimbriales varió de un 95% a 100% en los aislados provenientes de heces de bovino. Por otra parte, el gen autotransportador más frecuente fue *ehaA* tanto para los aislados de carne molida (87%; 26/30) como para los aislados de heces de bovino (100%;

37/37).El gen autotransportador menos frecuente en los aislados de ambos orígenes fue *cah* (Tabla 9).

Tabla 9. Presencia de genes de adhesinas fimbriales y de proteínas autotransportadoras en aislados STEC obtenidos de carne molida y heces de bovino (n=67)

| Tipo de proteína | Gene s | Carne Molida | Heces de Bovino | Total |
|--------------------------------|-------------|--------------|-----------------|-----------|
| Fimbrial | <i>crl</i> | 30 (100%) | 37 (100%) | 67 (100%) |
| | <i>csgA</i> | 30 (100%) | 36 (97%) | 66 (99%) |
| | <i>csgD</i> | 30 (100%) | 36 (97%) | 66 (99%) |
| | <i>fimH</i> | 30 (100%) | 35 (95%) | 65 (97%) |
| Autotransportador a | <i>cah</i> | 0 (0%) | 2 (5%) | 2 (3%) |
| | <i>ahaA</i> | 26 (87%) | 37 (100%) | 63 (94%) |
| | <i>ahaB</i> | 14 (47%) | 20 (54%) | 34 (51%) |
| | <i>espP</i> | 21 (70%) | 19 (51%) | 40 (60%) |
| | <i>flu</i> | 20 (67%) | 19 (51%) | 39 (58%) |
| Total | | 30 | 37 | 67 |

Se analizó la correlación entre la presencia de los genes asociados a biopelículas y la capacidad de formación de la misma en microplacas de PS. Al analizar la presencia de cada gen individualmente, los resultados mostraron que solo el gen *fimH* se correlacionó a la capacidad de formación de biopelícula a 23°C (p= 0,035). En el ensayo a 37°C, ningún gen se asoció significativamente con la capacidad de formar biopelícula (p>0.05).

Además, no se observó correlación entre un aumento del número de genes fimbriales y autotransportadores y una mayor capacidad de formación de biopelículas a 23°C o 37°C ($p > 0,05$).

6.III.2 Identificación de polimorfismos (SNPs) en secuencias nucleotídicas

Se identificaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) mediante el alineamiento de las secuencias de referencia para cada uno de los genes fimbriales y autotransportadores contra la secuencia extraída del genoma de los aislados STEC secuenciados. Se detectaron SNPs tanto en las secuencias de los aislados de carne molida como en las de heces de bovino y se determinó la presencia de alelos para cada gen. El gen que presentó mayor cantidad de alelos fue *espP* (30), seguido por los genes *ehaA* y *flu*. Los genes que presentaron menor cantidad de alelos fueron los genes *csgA* y *csgD* (Tabla 10).

Tabla 10. Número de alelos presentes por gen de las secuencias nucleotídicas encontradas en los aislados STEC.

| Proteína | gen | Numero de Alelos |
|------------------------|-------------|------------------|
| fimbrial | <i>crl</i> | 8 |
| | <i>csgA</i> | 5 |
| | <i>csgD</i> | 5 |
| | <i>fimH</i> | 18 |
| Autotransportador a | <i>cah</i> | 2 |
| | <i>ehaA</i> | 27 |
| | <i>ehaB</i> | 13 |
| | <i>espP</i> | 30 |
| | <i>flu</i> | 26 |

Se determinó el porcentaje de identidad de la secuencia encontrada en los aislados STEC con la secuencia consenso de las secuencias de referencia de cada gen (tabla 11, Anexo 10). Las secuencias de los genes *csgA* y *fimH* en los genomas de los aislados en estudio mostraron una identidad máxima del 100% con las secuencias de consenso. Las secuencias para el gen *ehaB* fueron las que mostraron el menor porcentaje de identidad (71,3%) con respecto al resto de los genes fimbriales y autotransportadores.

Tabla 11. Porcentaje máximo y mínimo de identidad de las secuencias nucleotídicas de los aislados STEC encontradas para cada gen fimbrial y autotransportador.

| Gen | Tamaño del gen (pb) | N° de aislados en que se encontró el gen | Identidad máxima (%) | Identidad Mínima (%) |
|--------------|----------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>crl</i> | 402 | 67 | 99,8 | 97,3 |
| <i>csg A</i> | 456 | 66 | 100 | 98,3 |
| <i>csg D</i> | 651 | 66 | 99,4 | 98,5 |
| <i>fimH</i> | 903 | 65 | 100 | 98,3 |
| <i>cah</i> | 3018 | 2 | 99,9 | 98,5 |
| <i>eha A</i> | 4050 | 63 | 98,5 | 96,9 |
| <i>eha B</i> | 2943 | 33 | 88,5 | 71,3 |
| <i>esp</i> | 3903 | 40 | 99,9 | 93,9 |

P

flu 3120 39 99,5 89,2

Se determinó el porcentaje de identidad con la secuencia de referencia de cada gen. Numero de acceso: 13703294, 13701123, 949119, 948847, 958808, 4714099, 957315, 1789732, 946540.

pb= Pares de bases.

6.III.3 Identificación de polimorfismos en las secuencias aminoacídicas

Se identificaron polimorfismos mediante el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de referencia para cada uno de los genes fimbriales y autotransportadores, contra la secuencia extraída del genoma de los aislados STEC secuenciados previamente traducida. Se detectaron polimorfismos tanto en las secuencias aminoacídicas de los aislados de carne molida como en las de heces de bovino.

El gen que presentó mayor cantidad de alelos fue *ehaA* con 25 alelos. Los genes que presentaron menor cantidad de alelos fueron *crl* y *csgD* (Tabla 12).

Tabla 12. *Número de alelos presentes por gen de las secuencias aminoacídicas encontradas en los aislados STEC para los genes fimbriales y autotransportadores.*

| Proteína | gen | Numero de Alelos |
|--------------------------------|-------------|-------------------------|
| fimbrial | <i>crl</i> | 2 |
| | <i>csgA</i> | 3 |
| | <i>csgD</i> | 2 |
| | <i>fimH</i> | 8 |
| Autotransportador a | <i>cah</i> | 2 |
| | <i>ehaA</i> | 25 |
| | <i>ehaB</i> | 10 |

| | |
|-------------|----|
| <i>espP</i> | 24 |
| <i>flu</i> | 23 |

Se determinó el porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídica encontrada en los aislados STEC con la secuencia proteica de referencia de cada gen. Las secuencias de los genes *crl*, *csgA*, *fimH* y *cah* en los genomas de los aislados en estudio mostraron una identidad máxima del 100% con las secuencias aminoacídica de consenso. Las secuencias para el gen *ehaB* fueron las que mostraron el menor porcentaje de identidad (64,2%) con respecto al resto de los genes fimbriales y autotransportadores (tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje máximo y mínimo de identidad de las secuencias aminoacídicas de los aislados STEC encontradas para cada gen fimbrial y autotransportador.

| Proteína | Gen | Tamaño de la proteína | Aislados en que se encontró el gen (n) | Identidad máxima (%) | Identidad Mínima (%) |
|-------------------|-------------|-----------------------|--|----------------------|----------------------|
| Fimbrial | <i>crl</i> | 133 | 67 | 100 | 98,5 |
| | <i>csgA</i> | 151 | 66 | 100 | 98,7 |
| | <i>csgD</i> | 216 | 66 | 99,1 | 99,1 |
| | <i>fimH</i> | 300 | 65 | 100 | 98,7 |
| Autotransportador | <i>cah</i> | 1006 | 2 | 100 | 98,7 |
| | <i>ehaA</i> | 1349 | 63 | 98,8 | 98 |
| | <i>ehaB</i> | 980 | 33 | 89,8 | 64,2 |

| | | | | |
|------------|------|----|------|------|
| esp | 1300 | 40 | 100 | 95,2 |
| P | | | | |
| flu | 1039 | 39 | 99,3 | 88,2 |

Se determinó el porcentaje de identidad con la secuencia de referencia de cada gen. Numero de acceso: 13703294, 13701123, 949119, 948847, 958808, 4714099, 957315, 1789732, 946540.

pb= Pares de bases.

Se realizó un análisis de acuerdo a los polimorfismos de la secuencia aminoacídica para los genes fimbriales y autotransportadores de los aislados STEC. Se correlacionó los polimorfismos según el alelo de las secuencias aminoacídicas de los aislados STEC con la capacidad de formar biopelícula para cada gen. Los resultados mostraron que a 23°C no hubo diferencias significativas entre los polimorfismos de las secuencias (según alelo) y capacidad de formar biopelícula ($p > 0,05$). Para el ensayo a 37°C solo hubo diferencias significativas entre los polimorfismos de las secuencias (según alelo) y capacidad de formar biopelícula para el gen *espP* ($p < 0,05$). Para el resto de los genes no se mostraron diferencias entre las dos variables (Rho-Spearman $p > 0,05$).

7 DISCUSIÓN

STEC es considerada un importante problema de salud pública debido a que tiene la capacidad de producir brotes de enfermedad transmitida por los alimentos con riesgo de complicaciones graves como el SHU en poblaciones susceptibles (ISP, 2014). Dentro de los elementos que juegan importantes roles en la patogenia de la enfermedad causada por STEC están las toxinas Shiga (Stx) (Etcheverría y Padola, 2013) y otros factores de virulencia como la intimina (gen *eae*) y la enterohemolisina (gen *hlyA*) (Shen *et al.* 2015; Xía *et al.* 2010). Estos factores se han detectado frecuentemente en cepas que causan enfermedades en humanos. Las infecciones por STEC son zoonóticas, y el principal reservorio es el ganado bovino. Debido a malas prácticas durante el faenamiento de los animales o en algún otro punto de la cadena productiva, la bacteria puede contaminar la carne y así servir como vehículo para la infección en humanos (Etcheverría y Padola, 2013). Además, las superficies de procesamiento también se contaminan por malas prácticas con estas heces de animales colonizados. En ellas se pueden formar biopelículas las que también pueden servir de fuente de contaminación para las carnes con STEC (Galié *et al.*, 2018).

En el primer objetivo de esta tesis se realizó el análisis comparativo de las características genotípicas de los aislados obtenidos desde heces bovinas y carne molida: ambas fuentes son importantes focos tanto de contaminación como de transmisión del patógeno. Para este objetivo, se determinó la presencia de los genes de virulencia más frecuentemente involucrados en enfermedades humanas: *stx*₁, *stx*₂, *eae* y *hlyA*. Los genes *stx* son el principal factor de virulencia de STEC, y estudios indican que *stx*₂ tendría un potencial patogénico muy superior a *stx*₁ (Paton y Paton, 2002; OPS, 2011). En nuestro estudio, *stx*₂ fue detectado con mayor frecuencia que *stx*₁ tanto en aislados de heces bovinas (88%) como en los de carne molida (77%). Estos resultados concuerdan con estudios realizados en Paraguay, Argentina, Brasil y en Países Bajos en aislados STEC de animales, donde más del 80% de los aislados poseen el gen *stx*₂ (Florentín *et al.*, 2018;

Franz *et al.* 2012; Padola *et al.* 2004) y con estudios realizados en Alemania, Argentina y Japón donde un 65% de los aislados de productos cárnicos presentaban el gen *stx*₂ (Brusa *et al.* 2013; Hoang *et al.* 2015; Xia *et al.* 2010). Sin embargo, los estudios realizados en Chile por Ríos *et al.* (1999) y por Borie *et al.* (1997) detectaron el gen *stx*₁ como el más prevalente en aislados de carne (72,5%) y de bovinos (100%), respectivamente. Además, esta diferencia puede deberse cambios epidemiológicos asociados a que aquellos primeros estudios fueron realizados hace dos décadas. Esto concuerda con resultados más recientes, los que describen un porcentaje cercano al 70% de aislados de STEC positivas al gen *stx*₂ en aislados STEC de heces bovinas y de 55% en productos cárnicos (Baeza, 2013; Vivanco, 2011). Es preocupante el alto porcentaje de *stx*₂ encontrados en nuestro estudio debido a su asociación a los casos más graves como SHU, en especial desde muestras de carne molida, alimento que es más frecuente y de fácil acceso por la población. Este es un peligro que podría relacionarse a un aumento en los cuadros más severos de esta patología ante posible presencia de brotes.

La producción de *stx* es esencial pero no suficiente para la virulencia de STEC. Existen otros factores que influyen sobre la virulencia de la bacteria. En nuestro estudio analizamos la presencia de dos de los principales factores de virulencia de STEC: la intimina (*eae*) y la enterohemolisina (*hlyA*) y junto a la presencia de los genes *stx*₁ y *stx*₂ se ordenaron en perfiles genéticos. En este estudio, el gen de la intimina (*eae*) estuvo presente en un aislado (0.5%, 1/186), y este aislado también resultó positivo para los genes *hlyA* y ambos *stx*. Resulta interesante que este aislado fue obtenido de heces bovinas. La presencia del gen *eae* se asocia significativamente con un mayor riesgo de diarrea con sangre en los seres humanos (Brooks *et al.* 2005), y estudios reflejan que la combinación de los genes *hlyA* y *eae* se ha asociado a la presentación de cuadros clínicos graves como el Síndrome Hemolítico Urémico en los pacientes. Por ejemplo, Ríos *et al.* (1999) observó que todas las cepas relacionadas a casos de SHU presentaban ambas toxinas y además eran *eae* positivas. Estudios realizados en Latinoamérica muestran un porcentaje cercano al 40% de *eae* en aislados de bovinos y

productos cárnicos (Llorente *et al.*, 2014; Hamond *et al.* 2012; Padola *et al.* 2004). En Chile, la mayor prevalencia del gen *eae* se ha encontrado en aislados de pacientes enfermos y alimentos, principalmente productos cárnicos, en un promedio de un 45% (Baeza, 2013; Vivanco, 2011; Rios *et al.* 1999; Borie *et al.* 1997). Este estudio solo detectó la presencia de un aislado positivo al gen *eae*. Sin embargo, este aislado podría ser potencialmente patógeno, teniendo en cuenta que además presenta el gen *stx₂*, *stx₁* y *hlyA*.

Los aislados de heces bovinos se organizaron en siete perfiles. El principal perfil de los aislados de heces de bovino fue *stx₂+hlyA+*. El gen *hlyA* es una toxina bacteriana definida como una sustancia que puede alterar el metabolismo normal de las células del huésped, produciendo efectos perjudiciales como la destrucción de la membrana celular de los eritrocitos y la lisis de células endoteliales (Bolton, 2011). Un 39% de los aislados presentó el gen *hlyA* en este estudio. Diversos estudios muestran prevalencias de sobre 80% del gen *hlyA* en aislados de productos cárnicos, contrastando con nuestro estudio (Rios *et al.* 1999; Hamond *et al.* 2012; Zweifel *et al.* 2013; Hoang *et al.* 2015). Además, se ha descrito que el gen *hlyA* está presente en el 96% de las cepas STEC aisladas de pacientes con diarrea aguda, síndrome disentérico y SHU, lo que sugiere que tiene un rol importante en las cepas STEC para producir infección en humanos (Vidal *et al.*, 2010). Se puede inferir que los aislados con el perfil *stx₂+hlyA+* podrían tener un potencial patógeno mayor que los aislados que no poseen el gen *hlyA*. Nuestros resultados indican que las heces de bovinos son un reservorio de patógenos para los humanos, y podría asociarse a una posterior contaminación de los alimentos a través de la cadena de producción de la carne y la contaminación de diferentes alimentos y aguas de distinta procedencia.

Los aislados de carne se agruparon en seis perfiles; el perfil más frecuente fue en el que los aislados tenían *stx₂* como único gen de virulencia. Este gen se ha asociado a enfermedad grave en humanos más frecuentemente que *stx₁* (Luna-Gierke *et al.*, 2014). Estos resultados muestran que existe STEC potencialmente patógena contaminando las carnes que se venden en Santiago. Las medidas de

control a nivel productivo y en especial durante el faenamiento del animal y la manipulación posterior de los productos cárnicos serán decisivas para evitar la transmisión de STEC potencialmente patógena al humano, por lo que es necesario reforzar la fiscalización y las buenas prácticas.

Se ha demostrado que aislamientos de STEC de diferentes orígenes (ganado, agua, alimentos y humanos) pueden formar biopelículas (Biscola *et al.*, 2011). Se cree que las biopelículas aumentan la supervivencia y la persistencia de STEC en ambientes hostiles, entre ellos en plantas de procesamiento de carne (Vogeleer *et al.*, 2014). En el segundo objetivo de esta tesis se evaluó la capacidad de 67 aislados STEC para formar biopelículas a 23°C y 37°C. Este ensayo se realizó con el método de cuantificación de biopelículas a través de microtitulación en placas de PS con tinción de cristal violeta. Este método ha sido validado por numerosos autores como una exitosa técnica para obtener resultados cuantitativos sobre la formación de biopelículas (Díez-García *et al.*, 2012; Lianou *et al.*, 2012; Steenackers *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos revelaron que 91% (61/67) de los aislados analizados formaron biopelícula. Resultados similares han sido publicados por varios autores, donde el promedio de formación de biopelícula en aislados STEC provenientes de humanos, heces de animales y alimentos, varió entre 83% y 100% (Taghadosi *et al.*, 2017; Picozzi *et al.*, 2017; Vogeleer *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2012).

Por otro lado, los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que existe una mayor capacidad de formar biopelículas a 23°C que a 37°C. Esto puede deberse a que, si bien, una menor temperatura de incubación puede disminuir la proliferación bacteriana, también puede favorecer la producción de biopelículas porque las cepas expresan componentes que no se produjeron en otras condiciones (Agarwal *et al.* 2011, Lianou y Koutsoumanis 2012). En STEC, uno de estos componentes son las fimbrias curli, la que se produce solamente bajo los 30°C de temperatura (De Oliveira *et al.* 2014, Cabarkapa *et al.* 2015, Piras *et al.* 2015). Algunos estudios como el de Stepanović *et al.* (2003) observaron en aislados de estafilococos un aumento en la producción de biopelículas a 30°C en

comparación con la incubación a 37°C. Piras *et al.* (2015) mostraron que en aislados de *Salmonella enterica* hubo una mayor producción de biopelículas a 22°C que a 35°C. Estos hallazgos indican que los factores involucrados en la producción de biopelículas tienen diferentes respuestas de acuerdo con la temperatura de incubación (Cabarkapa *et al.* 2015).

En este estudio, no se detectó una asociación entre la capacidad de formar biopelículas a 23°C y el origen del aislado ($p > 0,05$). La hipótesis del estudio indica que los aislados provenientes de carne molida tienen una mayor capacidad de formar biopelículas. Esto ya que en el entorno de las plantas de procesamiento de carne la formación de biopelícula confiere muchas ventajas a las células microbianas, como por ejemplo la resistencia física (deseccación), la resistencia mecánica (corrientes de líquidos en las tuberías) y la protección química (productos químicos, antimicrobianos y desinfectantes) (Flemming *et al.*, 2016). Sin embargo, con los resultados obtenidos en este estudio se podría inferir que los aislados de carne molida provendrían de células microbianas planctónicas de STEC y no de biopelículas que resistieron la presión selectiva del entorno de la planta. El estudio realizado por Ryu y Beuchat, (2005) mostró que células planctónicas de *E. coli* O157:H7 pueden resistir condiciones adversas como el uso de desinfectantes como el cloro, esto gracias a la presencia de EPS y fimbrias curli producidas por estas *E. coli* (Ryu y Beuchat, 2005). Estas estructuras pueden proteger a las células planctónicas contra la actividad bactericida de algunos desinfectantes (Ryu y Beuchat, 2005). Las células planctónicas pueden originarse directamente desde la contaminación con heces de animales portadores durante la evisceración, o de células planctónicas por contaminación cruzada con superficies o utensilios, o por contaminación por mala manipulación de operarios que podrían ser portadores de la bacteria y no tener una correcta higiene personal.

Por otro lado, en el ensayo a 37°C, donde la mayoría de los aislados de carne no formaron biopelículas y la mayoría de los aislados de heces de bovino formaron biopelícula débil, sí hubo diferencias estadísticamente significativas. Actualmente no existen estudios que asocien la capacidad de formar biopelículas

con el origen del aislado. Las muestras de heces de bovinos fueron tomadas en rebaños extensivos de leche y carne, azarosamente y directamente desde el recto del animal. Estudios demuestran que el sitio primario de colonización de STEC en el ganado es la unión recto-anal (Cote *et al.*, 2015). El intestino de los bovinos es el hábitat natural de la bacteria y cuando se exponen a ambientes extraintestinales, deben resistir la presión selectiva ambiental para garantizar su supervivencia. Teniendo esto en cuenta podemos suponer que la asociación que existió a 37°C, entre la capacidad de formar biopelículas según el origen del aislado, puede estar relacionada con que las muestras de aislados de heces de bovino provenientes del recto se encontraban a la temperatura interna del animal (39°C) (Segura *et al.*, 2018). Por lo tanto, ya que eran aislados que estaban adaptados a esa temperatura, los aislados tenían una mayor capacidad de formar biopelículas a 37°C. Sin embargo, son necesarios mayores estudios que puedan corroborar esta idea, ya que la temperatura solo es un parámetro dentro de los múltiples factores que influyen en la formación de biopelícula en una superficie.

Estudios muestran que la formación de biopelículas de STEC podría estar influenciada además por una variedad de factores ambientales, como la nutrición, la humedad, el pH y la temperatura; estos factores podrían favorecer o inhibir la formación de biopelículas (Kumar *et al.*, 2017, Uhlich *et al.*, 2014; Hennekinne *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010). Sin embargo, la literatura ha mostrado que la capacidad de formación de biopelícula de los aislados STEC depende de las características propias de las cepas y de las condiciones utilizadas en el estudio (Wang *et al.*, 2012). En nuestro estudio, ambos ensayos fueron realizados en las mismas condiciones, con los mismos aislados STEC, y cultivados en los mismos medios, por lo que el factor temperatura y las características propias de los aislados serían los posibles responsables de esta variación.

En el objetivo 3 de esta tesis se determinó la presencia de nueve genes fimbriales y autotrasportadores asociados a formación de biopelículas en los genomas de los aislados en estudio. Además, se analizaron las secuencias de los genes en búsqueda de polimorfismos, tanto en las secuencias nucleotídicas como

aminoacídicas, y se contrastaron estas secuencias con la capacidad de formar biopelícula de los aislados en estudio. Las fimbrias y los autotransportadores son factores de adhesión asociados con la formación de biopelículas en STEC (McWilliams y Torres, 2014). En este estudio, se observó que los genes fimbriales estuvieron presentes casi en el total de los aislados con porcentajes entre 97% y 100%. Esto es similar a otros trabajos en los que los genes para fimbria tipo 1 (*fimH*) y curli (*csgA*, *csgD*, *crl*) están presentes en aislados STEC en porcentajes sobre 94% (Dos Santos *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016; Cergole-Novella *et al.*, 2015; Biscola *et al.*, 2011). Por otro lado, la presencia de genes autotransportadores (*cah*, *ehaA*, *ehaB*, *espP*, *flu*) fue más variable, con porcentajes entre 3% y 94%. Los genes *ehaA*, *ehaB*, *espP* y *flu* estuvieron presentes en los aislados STEC sobre un 50%, esto concuerda con estudios en aislados STEC de diferentes orígenes (Dos Santos *et al.*, 2017; Vogeleer *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Easton *et al.*, 2011; Biscola *et al.*, 2011). Sin embargo, el gen *cah* estuvo presente en el 3% (2/67) de los aislados STEC, lo que es notoriamente diferente con datos de literatura, donde los estudios observan la presencia del gen *cah* en aislados STEC cercano a un 72% en promedio (Dos Santos *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016; Biscola *et al.*, 2011). Las diferencias presentadas con otros estudios pueden deberse al método utilizado para la identificación de los genes. La identificación de los genes se realizó desde la secuencia completa del genoma de los aislados STEC y buscando en ella la secuencia de cada gen, pero la mayoría de los estudios lo realizan a través de PCR. A pesar de esta diferencia, la búsqueda de los genes en la secuencia completa del genoma es un método más confiable, por lo que nuestro estudio entrega información más certera con respecto a los otros estudios (Aguilar-Bultet y Falquet, 2015).

En esta tesis, se estudió la asociación entre la presencia de cada gen fimbrial con la capacidad de formar biopelícula a 23°C, demostrándose que el gen *fimH* se asoció a la capacidad de formar biopelículas. Tanto las bacterias patógenas como las comensales tienen adhesinas que podrían participar en el proceso de adherencia (Etcheverría y Padola, 2013). En el caso del intestino bovino, el medio

ambiente, y otros sitios donde se sabe que persisten las bacterias, estudios indican que las cepas STEC O157 y no O157 expresan una amplia variedad de adhesinas, las que podrían desempeñar un papel clave en la persistencia en el reservorio rumiante o en la formación de biopelículas en superficies bióticas y abióticas (Farfán y Torres, 2012). Una de las adhesinas mejor estudiadas en *E. coli* son las fimbrias tipo 1, las cuales son codificadas por el gen *fimH*, y son las adhesinas más frecuentes en los aislamientos comensales y patógenos de *E. coli*, así como en otras Enterobacteriaceae. Estas fimbrias son críticas para la unión inicial estable a superficies bióticas y abióticas para varias cepas de *E. coli* (Florentín *et al.*, 2018). Nuestro estudio y la literatura muestra que existe asociación positiva entre la presencia del gen *fimH* en aislados STEC con mayor capacidad de formar biopelícula. Sin embargo, al realizar la asociación entre el aumento de la presencia de genes fimbriales y autotransportadores con la capacidad de formar biopelículas, no se observó una correlación en los aislados STEC. Estudios demuestran que la unión y la formación de biopelículas en *E. coli* es multifactorial y además puede ser el resultado del efecto combinado de varias adhesinas. Sin embargo, existe evidencia de la relación competitiva entre las fimbrias tipo 1 y Ag43 en la formación de biopelículas en *E. coli* K-12 (Hasman *et al.*, 1999; Lloyd *et al.*, 2012). Otro estudio demostró que la expresión de fimbria tipo 1 puede impedir la función de la agregación celular mediada por EhaA (Wells *et al.*, 2008). Estos estudios muestran que puede existir una relación competitiva entre estos componentes (proteínas fimbriales y autotransportadoras) que apoyarían la falta de asociación entre la presencia del aumento de los genes con la capacidad de formar biopelícula. Son necesarios estudios más actualizados y bajo estrictas condiciones experimentales para poder evaluar la asociación positiva o negativa propuesta que pudiese existir entre estos genes.

A pesar que los nueve genes fimbriales y autotransportadores considerados en este estudio se han asociado a formación de biopelículas en cepas STEC, estudios sugieren que se debe considerar que la expresión de estos genes está relacionada con las condiciones de cultivo particulares de la bacteria y que puede variar entre diferentes cepas incluso dentro del mismo serotipo (Florentín *et al.*,

2018). Esto quiere decir que la capacidad de formar biopelículas de un aislado STEC no depende sólo de la información genética, sino también del ecosistema y las condiciones ambientales que afectan a la bacteria (Rivelli y Guillén, 2015; Villegas *et al.*, 2013). Técnicas como el PCR en tiempo real (RT-qPCR o RT-PCR), es adecuada para el estudio de expresión de genes (Wagner, 2013) y podría haber complementado este estudio.

Por último, se correlacionaron los alelos de las secuencias aminoacídicas para cada uno de los genes fimbriales y autotransportadores en los aislados STEC con la capacidad de formar biopelículas. Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas entre los alelos de ningún gen y la capacidad de formar biopelículas a 23°C. Además, todas las secuencias aminoacídicas de los genes fimbriales y autotransportadores presentaron polimorfismos. Las secuencias para el gen *ehaA* presentaron el mayor número de alelos (25). Las secuencias para el gen *cah* solo presentaron 2 alelos, sin embargo, el gen solo se presentó en 2 aislados STEC. Esto muestra la diferencia entre las secuencias para un mismo gen que existen en nuestros aislados STEC debido a las mutaciones presentes.

Diversos estudios muestran la importancia de estos genes (*cah*, *crl*, *csgA*, *csgD*, *ehaA*, *ehaB*, *espP*, *fimH*, *flu*) en la formación de biopelículas. Por ejemplo, cepas mutantes para el gen *csgA* mostraron una disminución en la adhesión al tejido de plantas y mutantes *fimH* una adhesión inicial disminuida (Orndorff *et al.*, 2004; Cookson *et al.*, 2002). No obstante, estudios más recientes realizados en cepas *knock-out* para los genes fimbriales y autotransportadores incluidos en esta tesis, revelan que la sola presencia de determinados genes no sería decisiva para que la bacteria pueda adherirse y/o formar la biopelícula (Taghadosi *et al.*, 2017; McWilliams y Torres, 2013). Un ejemplo de esto es un estudio en el que se eliminó el gen *ehaA* de dos cepas y se observó que no hubo diferencias significativas en la formación de biopelículas (Wells *et al.*, 2008). En otro estudio la eliminación del gen *cah* redujo la formación de biopelículas en superficie abiótica en cepas STEC O157:H7; sin embargo, no afectó su capacidad para adherirse a la alfalfa (Torres *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2002). Carter *et al.* (2017) sugiere que la mutación

adaptativa es un mecanismo común en STEC para ajustar su colonización y supervivencia en condiciones cambiantes de hábitat (Carter *et al.*, 2017). Estas mutaciones mejoran la capacidad física de las células bacterianas bajo una presión selectiva particular. Esto puede verse reflejado en una mejor eliminación de nutrientes o en una mayor resistencia al estrés o a antibióticos (Wang *et al.*, 2010; Rogstam *et al.*, 2007). Sin embargo, no hubo correlación entre algún alelo y la capacidad de formar biopelícula en los aislados STEC, por lo que se concluye que esta capacidad de formar biopelículas depende de múltiples factores tanto de cultivo como del ambiente y de la propia cepa.

Este estudio entrega información de los genes asociados a formación de biopelículas en STEC, lo que puede aportar para futuras investigaciones. Además, muestra la importancia de que se implemente la vigilancia de estas comunidades multicelulares tanto en el ganado como en los predios y en la cadena productiva; esto debido a las malas prácticas que se pueden desarrollar sobre todo durante el faenamiento del animal y en la manipulación de la carne dentro de las plantas de procesamiento de carne, lo que permitiría la diseminación de la bacteria, contaminación de la carne u otros alimentos y llegada al consumidor.

8 CONCLUSION

En este estudio se encontró que el 84% (156/186) de los aislados STEC presentaban el gen *stx*₂, además de un aislado de carne molida que presentó los 4 genes (*stx*₁, *stx*₂, *hlyA* y *eae*). Estos hallazgos indican que los consumidores podrían estar en riesgo al tener contacto con aislados que pudiesen ser potencialmente patógenos y causar cuadros más severos de la enfermedad. Un 91% (61/67) de los aislados STEC seleccionados fueron capaces de formar biopelícula, sin embargo, esta capacidad no dependió del origen. Esto nos muestra que independiente del origen, STEC es capaz de formar biopelículas en las condiciones adecuadas, lo que puede incidir en un mayor riesgo de contaminación de alimentos y pudiendo llegar al consumidor. También se

identificaron genes asociados a formación de biopelículas en los aislados STEC, sin embargo, no presentaron correlación con la capacidad de formar biopelícula de los aislados. Además, se observaron diferentes alelos para los genes fimbriales y autotransportadores en los aislados STEC, pero ningún alelo mostró correlación con la capacidad de formar biopelícula de los aislados STEC. Esto confirma que la capacidad de formar biopelícula es multifactorial.

De acuerdo a estos resultados podemos concluir que las dos hipótesis de este estudio se rechazan, ya que no hay diferencias significativas entre la capacidad de formar biopelículas según su origen y sólo el gen *fimH* mostró una correlación entre su presencia y la capacidad de formar biopelículas.

Debido a la complejidad de las biopelículas son necesarios futuros estudios que requieren de una combinación de diferentes enfoques, tanto experimentales como bioquímicos, genéticos y físicos para abordar las diferentes aristas que influyen en la formación de las biopelículas. Con esto surgirán nuevas estrategias para la prevención y el control de las biopelículas, las que dependerán de una comprensión más completa de lo que hace que el fenotipo de biopelículas sea tan diferente del fenotipo planctónico.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. **AGARWAL, R.; SINGH, S.; BHILEGAONKAR, K.; SINGH, V.** 2011. Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different Salmonella serotypes. 18(4): 1493-1498.
2. **AGUILAR-BULTET, L.; FALQUET, L.** 2015. Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Rev Salud Anim*, 37(2), 125-132.
3. **ARDISSINO, G.; POSSENTI, I.; TEL, F.; TESTA, S.; PAGLIALONGA, F.** 2013. "Letter to the Editor: Time to change the definition of hemolytic uremic syndrome". *Eur J Intern Med*.
4. **ASLAM, M.; GREER, G.; NATTRESS, F.; GILL, C.; MCMULLEN, L.** 2004. Análisis genotípico de *Escherichia coli* recuperado del producto y equipo en una planta de envasado de carne. *J. Appl. Microbiol.* 97, 78–86.
5. **BAEZA, C.** 2013. Aislamiento y caracterización de cepas de *Escherichia coli* productor de Shiga toxina desde Carne de vacuno nacional e importada, distribuida en los principales supermercados de la provincia de Santiago. Tesis Magister en Salud Pública y Sistema de Salud. Santiago, Chile. Universidad Mayor. 77 pp.
6. **BAI, X., WANG, H., XIN, Y., WEI, R., TANG, X., ZHAO, A., SUNA, H., ZHANG, W., WANG, Y., XU, Y., ZHANG, Z., LI, Q., XU, J., XIONG, Y.** 2015. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. *Int J Food Microbiol.* 200. 31-38.
7. **BELOIN, C., ROUX, A., & GHIGO, J. M.** 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322, 249-289.
8. **BERNE, C.; DUCRET, A.; HARDY, G.; BRUN, Y.** 2015. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Spectr.* 3(4).
9. **BISCOLA, F.; ABE, C.; GUTH, B.** 2011. Determination of Adhesin Gene Sequences in and Biofilm Formation by, O157 and Non-O157 Shiga Toxin-

- Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Sources. *J Appl Environ Microbiol.* 77(7), 2201-2208.
10. **BOLTON, D.** 2011. Verocytotoxigenic (Shiga Toxin-Producing) *Escherichia coli*: Virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. *Foodborne Pathog Dis*, 8(3): 357-65.
 11. **BORIE, C.; MONREAL, Z.; GUERRERO, P.; SANCHEZ, M.; MARTINEZ, J.; ARELLANO, C.; PRADO, V.** 1997. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Arch. med. vet.* Vol 29 (2)
 12. **BROCKMEYER, J.; SPELTEN, S.; KUCZIUS, T.; BIELASZEWSKA, M.; KARCH, H.** 2009. Structure and function relationship of the autotransport and proteolytic activity of EspP from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. PLoS ONE 4:e6100.
 13. **BROOKS, J.; SOWERS, E.; WELLS, J.; GREENE, K.; GRIFFIN, P.; HOEKSTRA, R.; STROCKBINE, N.** 2005. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in the United States, 1983–2002, *J Infect Dis*, 192, (8), pp 1422–1429.
 14. **BRUSA, V.; ALIVERTI, V.; ALIVERTI, F.; ORTEGA, E.; DE LA TORRE, J.; LINARES, L.; SANZ, M.; ETCHEVERRÍA, A.; PADOLA N.; GALLI, L.; PERAL, P.; COPES, J.; LEOTTA, G.** 2013. Shiga toxin – producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol.* 2. 6 pp.
 15. **BUVENS, G.; PIÉRARD, D.** 2012. Low prevalence of STEC autotransporter contributing to biofilm formation (Sab) in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolates of humans and raw meats. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Jul; 31(7): 1463–1465.
 16. **CABARKAPA, I.; SKRINJAR, M.; LEVIC, J.; KOKIC, B.; BLAGOJEV, N.; MILANOV, D.; SUVAJDZIC, L.** 2015. Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis in vitro. *Acta Vet., Beogr.* 65:371-389.
 17. **CALDORIN, M.; DE ALMEIDA, I.; PERESI, J.; ALVES, E.** 2013. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil

e sua importância em saúde pública. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 10, 110, p. 4-20

18. **CARTER, M.; BRANDL, M.; KUDVA, I.; KATANI, R.; MOREAU, M.; KAPUR, V.** 2017. Conditional Function of Autoaggregative Protein Cah and Common *cah* Mutations in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *J Appl Environ Microbiol.* 84(1), e01739-17.
19. **CEBULA, T.; PAYNE, W.; FENG, P.**1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 33(1):248–250.
20. **CERGOLE-NOVELLA, M.; PIGNATARI, A.; GUTH, B.** 2015. Adhesion, biofilm and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 46(1), 167-71.
21. **CHEN, C. Y., HOFMANN, C.; COTTRELL, B.; STROBAUGH, T.; PAOLI, G.; NGUYEN, L.; YAN, X.; UHLICH, G.** 2013. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming capabilities in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *PLoS ONE* 8:e84863
22. **CHEN, J.; GRIFFITHS, M.** 1998. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Lett Appl Microbiol.* 27:369-371
23. **CIMDINS, A.; SIMM, R.** 2017. Semiquantitative analysis of the red, dry, and rough colony morphology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* using Congo red. *Methods Mol Biol* 1657:225–241.
24. **COLELLO, R.; CACERES, M.; RUIZ, M.; SANZ, M.; ETCHEVERRIA, A.; PADOLA, N.** 2016. "From farm to table: follow-up of shiga toxin-producing *Escherichia coli* throughout the pork production chain in argentina." *Front Microbiol.* 93. 1-7

25. **COOKSON, A.; COOLEY, W.; WOODWARD, M.** 2002. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 195–205
26. **COTE, R.; KATANI, R.; MOREAU, M.; KUDVA, I.; ARTHUR, T.; DEBROY, C.; MWANGI, M.; ALBERT, I.; RAYGOZA GARAY, J.; LI, L.; BRANDL, M.; CARTER, M.; KAPUR, V.** 2015. Comparative analysis of super-shedder strains of *Escherichia coli* O157:H7 reveals distinctive genomic features and a strongly aggregative adherent phenotype on bovine rectoanal junction squamous epithelial cells. *PLoS one*, 10(2), e0116743.
27. **DANG, H.; LOVELL, C.** 2016. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80, 91-138.
28. **DE OLIVEIRA D.; FERNANDES, A.; KANENO, R.; SILVA, M.; ARAÚJO, J.; SILVA, N.; RALL, V.** 2014. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathog. Dis.* 11:478-483.
29. **DÍEZ-GARCÍA, M.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.** 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* 31:173-180.
30. **DOS SANTOS, L.; BISCOLA, F.; GONÇALVES, E.; GUTH, B.** 2017. Biofilm formation, invasiveness and colicinogeny in locus of enterocyte and effacement negative O113:H21 Shigatoxigenic *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol.* 122(4):1101–9.
31. **DOUROU, D.; BEAUCHAMP, C.; YOON, Y.; GEORNARAS, I.; BELK, K.; SMITH, G.; NYCHAS, G.; SOFOS, J.** 2011. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int. J. Food. Microbiol.* 149, 262-268
32. **EASTON, D.; TOTSIKA, M.; ALLSOPP, L.; PHAN, M.; IDRIS, A.; WURPEL, D.; SHERLOCK, O.; ZHANG, B.; VENTURINI, C.; BEATSON, S.; MAHONY, T.; COBBOLD, R.; SCHEMBRI, M.** 2011. Characterization of

- EhaJ, a New Autotransporter Protein from Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 2, 120.
33. **EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEN, A.** 2002. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. *Journal of clinical microbiology*, 40(12), 4585-93.
 34. **ELSE, T.; PANTLE, C.; AMY, P.** 2003. Boundaries for biofilm formation: humidity and temperature. *J Appl Environ Microbiol*. 69(8), 5006-10.
 35. **ETCHEVERRIA, A.; PADOLA, N.** 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence J.4*:366–372
 36. **FAO/WHO STEC EXPERT GROUP.** 2019. Hazard Identification and Characterization: Criteria for Categorizing Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* on a Risk Basis. *J Food Prot* 82:1, 7-21
 37. **FARFAN, M.; TORRES, A.** 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect Immun*. 80:903–13.
 38. **FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; DE REU, K.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRIX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCHA, S.; MOUSSIEGT, S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O.** 2013. Review of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol*. 162:190-212.
 39. **FASEL, D.; MELLMANN, A.; CERNELA, N.; HÄCHLER, H.; FRUTH, A.; KHANNA, N.; EGLI, A.; BECKMANN, C.; HIRSCH, H.; GOLDENBERGER, D.; STEPHAN, R.** 2014. Hemolytic uremic syndrome in a 65 year-old male linked to a very unusual type of stx2e and eae harboring O157:H49 Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 52 1301–1303.
 40. **FERENS, W.; HOVDE, C.** 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 465–487.

41. **FERNANDEZ, R.; RODRIGUEZ, C.; RODRIGUEZ, I.; GOMEZ, F.** 2003. *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. *Revista Cubana de Pediatría* [online]. Vol.75, n. ISSN 1561-3119. [En línea] http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312003000300010&lng=es&nrm=iso Disponible: 2018-02-09.
42. **FIJAN, S.; ŠOSTAR-TURK, S.** 2010. Antimicrobial Activity of Selected Disinfectants Used in a Low Temperature Laundering Procedure for Textiles. *Fibres Text East Eur.* 78.
43. **FLEMMING, H.; WINGENDER, J.** 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623–633.
44. **FLEMMING, H.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S.; KJELLEBERG, S.** 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575.
45. **FLORENTÍN, M.; ACUÑA, P.; ROJAS, N.; RODRÍGUEZ, F.; GUILLÉN, R.** 2018. Portación de *fimH* en aislados de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga provenientes de ganado bovino, Departamento Cordillera, Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 16(1): 33-38
46. **FOULADKHAH, A.; GEORNARAS, I.; SOFOS, J.** 2013. Biofilm formation of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella typhimurium* and newport and their inactivation by sanitizers. *J. Food Sci.* 78, M880-M886
47. **FRANZ, E.; VAN HOEK, A.; VAN DER WAL, F.; DE BOER, A.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, A.; VAN DER ZWALUW, K.; AARTS, H.; HEUVELINK, A.** 2012. Genetic features differentiating bovine, food, and human isolates of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in The Netherlands. *J. clinical microbiol.* 50(3), 772-80.
48. **FRANZIN, F.; SIRCILI, M.** 2015. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *BioMed Res. Int.*, 2015, 534738.

49. **FRATAMICO, P.; STROBAUGH, T.** 1998. Simultaneous detection of *Salmonella spp* and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Ind Microbiol Biotechnol.*21: 92-98.
50. **FUENTE, R.; LA HORCAJO, P.; DOM, G.** 2015. Association of vt1c with verotoxin-producing *Escherichia coli* from goats and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 334 332–334.
51. **GALIÉ, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E.; VILLAR, C.; LOMBÓ, F.** 2018. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol*, 9, 898.
52. **GÓMEZ, J.; GÓMEZ, M.; BAS, P.; RAMOS, C.; CAFINI, F.; MAESTRE, J.; PRIETO, J.** 2013. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? *Rev. Esp. Quimioter* 26(2):97-102.
53. **GOULD, L.; MODY, R.; ONG, K.; CLOGHER, P.; CRONQUIST, A.; GARMAN, K.; LATHROP, S.; MEDUS, C.; SPINA, N.; WEBB, T.; WHITE, P.; WYMORE, K.; GIERKE, R.; MAHON, B.; GRIFFIN, P.** 2013. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000–2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis.*10:453–460.
54. **GYLES, C.** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci.* Mar; 85(13 Suppl): E45–E62.
55. **HASMAN, H.; CHAKRABORTY, T.; KLEMM, P.** 1999. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J. Bacteriol.* 181(16), 4834-41.
56. **HENDERSON, H.** 2008. Direct and indirect zoonotic transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Am Vet Med Assoc.* 232: 848–859.
57. **HENDERSON, I. OWEN, P.** 1999. The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported proteins and is regulated by a novel mechanism involving Dam and OxyR. *J. Bacteriol.*, 181, 2132–2141.

58. **HENNEKINNE, J.; BUYSER, M.; DRAGACCI, S.** 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 815–836
59. **Hoang Minh S., Kimura E., Hoang Minh D., Honjoh K., Miyamoto T.** 2015. Virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw meats and clinical samples. *Microbiol. Immunol.* 59, 114–122.
60. **HOFER, E.; CERNELA, N.; STEPHAN, R.** 2012. Shiga toxin subtypes associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from red deer, roe deer, chamois, and ibex. *Foodborne Pathog. Dis.* 9 792–795.
61. **HURLOW, J.; COUCH, K.; LAFORET, K.; BOLTON, L.; METCALF, D.; BOWLER, P.** 2015. Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. *Advances in wound care*, 4(5), 295-301.
62. **INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE (ISP).** 2014. Boletín Vigilancia de laboratorio de *E. coli productora de toxina Shiga*. Chile, 2007 – 2013. Vol. 4, No. 2, febrero. [En línea] <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/STEC.pdf>>
63. **JOHNSON, J.; STELL, A.** 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogenetic and host compromise. *J Infect Dis* 181: 261-272.
64. **KAPLAN, J.** 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 89(3), 205-18.
65. **KARMALI, M.; GANNON, V.; SARGEANT, J.** 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 140. 360 - 370.
66. **KARMALI, M.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, S.; REID-SMITH, R.; ISAAC-RENTON, J.; CLARK, C.; RAHN, K.; KAPER, J.** 2003. Association of genomic O-island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4930-4940
67. **KEEN, E.** 2012. Paradigms of pathogenesis: targeting the mobile genetic elements of disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2, 161.

68. **KRÜGER, A.; LUCCHESI, P.** 2015. Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology* 161, 451–462.
69. **KUMAR, A.; ALAM, A.; RANI, M.; EHTESHAM, N.; HASNAIN, S.** 2017. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 307:481–489.
70. **LAVERTY, G.; GORMAN, S.; GILMORE, B.** 2014. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens*. Sep; 3(3): 596–632.
71. **LEE, W.; HOONAHN, C.; HONG, S.; KIM, S.; LEE, S.; JEYONG YOON, Y.** 2010. Evaluation of surface properties of reverse osmosis membranes on the initial biofouling stages under no filtration condition. *J Membrane Sci.* 351, (1–2) 112-122.
72. **LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K.** 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 160 (2): 171–178.
73. **LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K.** 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 160 (2): 171–178.
74. **LLORENTE, P.; BARNECH, L.; IRINO, K.; RUMI, M.; BENTANCOR, A.** 2014. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef collected in different socioeconomic strata markets in Buenos Aires, Argentina. *BioMed research international*, 2014, 795104.
75. **LLOYD, S.; RITCHIE, J.; TORRES, A.** 2012. Fimbriation and curliation in *Escherichia coli* O157:H7: a paradigm of intestinal and environmental colonization. *Gut microbes*, 3(3), 272-6.
76. **LUNA-GIERKE, R.; GRIFFIN, P.; GOULD, L.; HERMAN, K.; BOPP, C.; STROCKBINE, N.; MODY, R.** 2014. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol Infect.* 1–11.
77. **MAJOWICZ, S.; SCALLAN, E.; JONES-BITTON, A.; SARGEANT, J.; STAPLETON, J.; ANGULO, F.; YEUNG, D.; KIRK, M.** 2014. Incidencia mundial de infecciones por *Escherichia coli* humanas productoras de toxina

Shiga: una revisión sistemática y síntesis de conocimientos. Patógenos transmitidos por los alimentos. 11: 447–455.

78. **MAKINO, K.; ISHII, K.; YASUNAGA, T.; HATTORI, M.; YOKOYAMA, K.; YUTSUDO, C.; KUBOTA, Y.; YAMAICHI, Y.; IIDA, T.; YAMAMOTO, K.; HONDA, T.; HAN C.; OHTSUBO, E.; KASAMATSU, M.; HAYASHI, T.; KUHARA, S.; SHINAGAWA, H.** 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res* 5: 1–9.
79. **MARTIN, A.; BEUTIN, L.** 2011. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *Int. J. Food Microbiol* 146:99–104.
80. **MASANA, M.; D'ASTEK, B.; PALLADINO, P.; GALLI, I.; DEL CASTILLO, L.; CARBONARI, C.; LEOTTA, G.; VILACOBIA, E.; IRINO, K.; RIVAS M.** 2011. Genotypic characterization of non-O157 *Shiga toxin*-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *J Food Prot.* 74(12):2008–17.
81. **MATHUSA, E.; CHEN, Y.; ENACHE, E.; HONTZ, L.** 2010. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *J Food Prot.* 73, 1721-1736.
82. **MAUNDERS, E.; WELCH, M.** 2017. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, 364(13), fnx120.
83. **MAURER, J.; BROWN, T.; STEFFENS, W.; THAYER, S.** 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 42:106–118.
84. **MCWILLIAMS, B.; TORRES, A.** 2014. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesins. *Microbiol. Spectr* 2(3)
85. **MICHANIE, S.** 2003. *Escherichia coli* O157:H7 La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. [En línea]<http://bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Escherichia-coli-O157-H7.pdf> Disponible: 04-02-2018

86. MIKO, A.; RIVAS, M.; BENTANCOR, A.; DELANNOY, S.; FACH, P.; BEUTIN, L. 2014. Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer, and humans from Argentina and Germany. *Front Cell Infect Microbiol.* 4, 78.
87. MIR, R.; WEPPELMANN, T.; KANG, M.; BLISS, T.; DILORENZO, N.; LAMB, G.; HAN, S.; CHEOL, K. 2014. "Association between animal age and the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a cohort of beef cattle". *Vet Microbiol*, 325-331.
88. MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. 2013. *Enterobacteriaceae*. *Med. Microbiol. Seven Ed. ElSevier-Saunders*, Philadelphia, PA.
89. NAVIA, P.; VILLADA, H.; MOSQUERA, S. 2010. Las biopelículas en la industria de alimentos. *Facd. Cs. Agr.* 8 (2): 118-128.
90. NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. 2012. *Enterohemorrhagic E.coli* (EHEC) Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 1-7.
91. OGASAWARA, H.; YAMADA, K.; KORI, A.; YAMAMOTO, K.; ISHIHAMA, A. 2010. Regulation of the *Escherichia coli* *csgD* promoter: interplay between five transcription factors. *Microbiology.* 156: 2470–2483.
92. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). 2001. Manual de procedimientos "Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O157 y no- O157 a partir de especímenes clínicos". *Servicio Fisiopatogenia Departamento de Bacteriología INEI-ANLIS* [en línea] <<http://www.anlis.gov.ar/brote-de-stec/EscherichiaClinica.pdf>> Disponible: 04-02-2018
93. ORNDORFF, P.; DEVAPALI, A.; PALESTRANT, S.; WYSE, A.; EVERETT, M.; BOLLINGER, R.; PARKER, W. 2004. Immunoglobulin-mediated agglutination of and biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 require the type 1 pilus fiber. *Infect Immun.*72:1929–1938.
94. OSMAN, K.; MUSTAFA, A.; ELHARIRI, M.; ABDELHAMED, G. 2012. Identification of serotypes and virulence markers of *Escherichia coli* isolated from human stool and urine samples in Egypt. *Indian J. Med. Microbiol.*, 30: 308-313.

95. **OTEIZA, J.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; RIVAS, M.** 2006. Isolation and characterization of *Shiga toxin*-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). *Food Microbiol.* 23 (3):283–8.
96. **OTTER, J.; VICKERY, K.; WALKER, J.; DELANCEY PULCINI, E.; STOODLEY, P.; GOLDENBERG, S.; SALKELD, J.; CHEWINS, J.; YEZLI, S.; EDGEWORTH, J.** 2014. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: Implications for hospital cleaning and disinfection. *J Hosp Infect.* 89.
97. **PADOLA N. L., SANZ M. E., BLANCO J. E., BLANCO M., BLANCO J., ETCHEVERRIA A. I., ARROYO, G.; ULSRA, M.; PARMA, A.** 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* 100, 3–9
98. **PARK, J.; CHEN, J.** 2015. Control of the Biofilms Formed by Curli- and Cellulose-Expressing Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Using Treatments with Organic Acids and Commercial Sanitizers. *J Food Prot*, 78, (5), pp. 990-995.
99. **PATON A.; PATON, J.** 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 271–274
100. **PICOZZI, C.; ANTONIANI, D.; VIGENTINI, I.; FOSCHINO, R.; KNEIFEL, W.** 2017. Genotypic characterization and biofilm formation of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*; 364(2).
101. **PIRAS, F.; FOIS, F.; CONSOLATI, S.; MAZZA, R.; MAZZETTE, R.** 2015. Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. *J. FoodProt.* 78:1875-1878.
102. **POLIFRONI, R.; ETCHEVERRÍA, A.; SANZ, M.; CEPEDA, R.; KRÜGER, A.; LUCCHESI, P.; PADOLA, N.** 2012. Molecular characterization of *Shiga toxin*-producing *Escherichia coli* isolated from the environment of a dairy farm. *Curr microbiol.* 65(3), 337-343.

103. **PRADO, V.; CAVAGNARO, F.** 2008. Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos. *Rev chilena infectol.* 25(6), 435-444.
104. **PRATT, L.; KOLTER, R.** 1998. Análisis genético de la formación de biopelículas de *Escherichia coli*: definición de los roles de flagelos, motilidad, quimiotaxis y pili de tipo I. *Mol. Microbiol.* 30: 285–293.
105. **RAVVA, S.; SARREAL, C.; COOLEY, M.** 2016. Expression of Curli by *Escherichia coli* O157:H7 Strains Isolated from Patients during Outbreaks Is Different from Similar Strains Isolated from Leafy Green Production Environments. *Front Cell Infect Microbiol.* 6, 189.
106. **RESTIERI, C.; GARRISS, G.; LOCAS, M.; DOZOIS, C.** 2007. Autotransporter-Encoding Sequences Are Phylogenetically Distributed among *Escherichia coli* Clinical Isolates and Reference Strains. *Appl Environ Microbiol.* 73 (5), 1553–1562.
107. **RIOS, M.; PRADO, V.; TRUCKSIS, M.; ARELLANO, C.; BORIE, C.; ALEXANDRE, M.; FICA, A.; LEVINE, M.** 1999. Clonal diversity of chilean isolates of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with Hemolytic-Uremic Syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J. Clin. Microbiol.* 778-781.
108. **RISTOW, L.; WELCH, R.** 2016. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? *Biochim Biophys Acta* 1858: 538–545.
109. **RIVELLI, S.; GUILLÉN, R.** 2015. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados de *Escherichia coli* provenientes de ganado bovino del Paraguay. [master's thesis]. Paraguay: Universidad Nacional de Asunción.
110. **RIVERA-BETANCOURT, M.; SHACKELFORD, S.; ARTHUR, T.; WESTMORELAND, K.; BELLINGER, G.; ROSSMAN, M.; REAGAN, J.; KOOHMARAIE, M.** 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two

- geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *J. Food Prot.* 67, 295–302.
111. **RIVERO, M.; PADOLA, N.; ETCHEVERRIA, A.; PARMA, A.** 2004. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina Buenos Aires.* Vol.64 (4) 352-356.
112. **ROGSTAM, A.; LARSSON, J., KJELGAARD, P.; VON WACHENFELDT, C.** 2007. Mechanisms of adaptation to nitrosative stress in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 189:3063–3071.
113. **ROJAS-LOPEZ, M.; MONTERIO, R.; PIZZA, M.; DESVAUX, M.; ROSINI, R.** 2018. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. *Front Microbiol.* 9, 440.
114. **RYU, J.; BEUCHAT, L.** 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *J Appl Environ Microbiol*, 71(1), 247-54.
115. **SCHEMBRI, M.; KJAERGAARD, K.; KLEMM, P.** 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 48: 253-267
116. **SEGURA, A.; AUFFRET, P.; BIBBAL, D.; BERTONI, M.; DURAND, A.; JUBELIN, G.; KÉROURÉDAN, M.; BRUGÈRE, H.; BERTIN, Y.; FORANO, E.** 2018. Factors Involved in the Persistence of a Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Strain in Bovine Feces and Gastro-Intestinal Content. *Front Microbiol*, 9, 375.
117. **SHEN, J.; RUMP, L.; JU, W.; SHAO, J.; ZHAO, S.; BROWN, E.; MENG, J.** 2015. Virulence characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from food, humans and animals. *Food Microbiol.* 50 20–27.
118. **STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.** 2012. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45: 502-5031.

119. **STEPANOVIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; MIJAČ, V.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M.** 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol.* 20:339-343.
120. **STRUS, M.** 1997. Action of physical agents on microorganisms. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 48(3):263-8.
121. **TAGHADOSI, R.; SHAKIBAIE, M.; GHANBARPOUR, R.; HOSSEINI-NAVE, H.** 2017. Role of antigen-43 on biofilm formation and horizontal antibiotic resistance gene transfer in non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains. *Iran J Microbiol*, 9(2), 89-96.
122. **TELLEZ, S.** 2010. Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria [En línea] <<https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industriaalimentaria.php>> (Disponible: 10-12-2018)
123. **TENAILLON, O., SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E.** 2010. La genética de la población del comensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 8 : 207–217.
124. **TORO, M.; CAO, G.; RUMP, L.; NAGARAJA, T.; MENG, J.; GONZALEZ-ESCALONA, N.** 2015. Secuencias del genoma de 64 cepas de *Escherichia coli* productoras de *toxina Shiga* no O157: H7. *Anuncios de genoma*, 3 (5), e01067-15.
125. **TORO, M.; RIVERA, D.; JIMÉNEZ, M.; DÍAZ, L.; NAVARRETE, P.; REYES-JARA, A.** 2018. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, Chile, *Food Microbiol*, 75, pp 55-60.
126. **TORRES, A.** 2016. *Escherichia coli* in the Americas. Springer; Cham, Switzerland.
127. **TORRES, A.** 2010. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham Science; Bentham, UK.
128. **TORRES, A.; JETER, C.; LANGLEY, W.; MATTHYSSE, A.** 2005. Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human

- epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Appl Environ Microbiol* 71:8008–8015.
129. **TORRES, A.; PERNA, N.; BURLAND, V.; RUKNUDIN, A.; BLATTNER, F.; KAPER, J.** 2002. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 45, 951–966.
130. **TSENG, M.; FRATAMICO, P.; BAGI, L.; DELANNOY, S.; FACH, P.; MANNING, S.; FUNK, J.** 2014a. Diverse virulence gene content of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from finishing swine. *J Appl Environ Microbiol.* 80(20), 6395-402.
131. **TSENG, M.; FRATAMICO, P.; MANNING, S.; FUNK, J.** 2014b. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine: the public health perspective. *Anim. Health Res. Rev.* 15 1–13.
132. **UHLICH, G.; CHEN, C.; COTTRELL, B.; NGUYEN, L.** 2014. Growth media and temperature effects on biofilm formation by serotype O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol Lett.*, 354, (2), 1 Pp 133–141.
133. **ULETT, G.; WEBB, R.; SCHEMBRI, M.** 2006. Antigen-43-mediated autoaggregation impairs motility in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 152:2101–2110.
134. **VALILIS, E.; RAMSEYA, A.; SIDIQB, S.; HERBERT L.** 2018. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*—A poorly appreciated enteric pathogen: Systematic review. *Int J Infect Dis* 76, 82 – 87
135. **VAN GERVEN, N.; VAN DER VERREN, S.; REITER, D.; REMAUT, H.** 2018. The Role of Functional Amyloids in Bacterial Virulence. *J. Mol. Biol.* 430(20), 3657- 3684.
136. **VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; GALVÃO, J.; MAZINE, M.; DA GLORIA, E.; FERREIRA DE, T.** 2019. Anti-biofilm efficacy of single and binary treatments based on plant essential oils against *Escherichia coli* persistent in food-processing facilities. *Food Sci. Technol. Int.*

137. **VIDAL, R.; OÑATE, A.; SALAZAR, Y.; PRADO, V.** 2010. Shigatoxin Producing *Escherichia coli* in latin America. 179-190.
138. **VILLEGAS, N.; BARONETTI, J.; ALBESA, I.; POLIFRONI, R.; PARMA, A.; ETCHEVERRÍA, A.; BECERRA, M.; PADOLA, N.; PARAJE, M.** 2013. Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *SCI WORLD J.* 607258.
139. **VIVANCO, S.** 2011. Detección de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* productoras de Shigatoxina aisladas de bovinos. [En línea] <<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131491/Detecci%C3%B3n-de-genes-de-virulencia-en-cepas-de-Escherichia-coli-productoras-de-shigatoxina-aisladas-de-bovinos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> (Disponible: 01-06-2018)
140. **VOGELEER, P.; TREMBLAY, Y.; JUBELIN, G.; JACQUES, M.; HAREL, J.** 2016. Biofilm-Forming Abilities of *Shiga Toxin*-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Human Infections. *J Appl Environ Microbiol.* 82(5), 1448-1458.
141. **VOGELEER, P.; TREMBLAY, Y.; MAFU, A.; JACQUES, M.; HAREL, J.** 2014. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of *Shiga-toxin* producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 5, 317.
142. **WAGNER, E.** 2013. Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Methods Mol. Biol.* 1027, 19–45
143. **WANG R.; BONO, J.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.; HARHAY, D.** 2012. Biofilm formation by *Shiga toxin*-producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. *J. Food. Prot.* 75, 1418-1428
144. **WANG, J.; STANFORD, K.; MCALLISTER, T.; JOHNSON, R.; CHEN, J.; HOU, H.; ZHANG, G.; NIU, Y.** 2016. Biofilm formation, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of nine serogroups of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog. Dis.* 13, 316–324.

145. **WANG, L.; SPIRA, B.; ZHOU, Z.; FENG, L.; MAHARJAN, R.; LI, X.; LI, F.; MCKENZIE, C.; REEVES, P.; FERENCI, T.** 2010. Divergence involving global regulatory gene mutations in an *Escherichia coli* population evolving under phosphate limitation. *Genome Biol Evol* 2:478–487.
146. **WELLS, T.; MCNEILLY, T.; TOTSIKA, M.; MAHAJAN, A.; GALLY, D.; SCHEMBRI, M.** 2009. The *Escherichia coli* O157:H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA response in O157:H7 challenged cattle. *Environ Microbiol* 11:1803–1814.
147. **WELLS, T.; SHERLOCK, O.; RIVAS, L.; MAHAJAN, A.; BEATSON, S.; TORPDAHL, M.; WEBB, R.; ALLSOPP, L.; GOBIUS, K.; GALLY, D.; SCHEMBRI, M.** 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
148. **WHITE, A.; GIBSON, D.; COLLINSON, S.; BANSER, P.; KAY, W.** 2003. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *J Bacteriol.* 185:5398-5407.
149. **WHITE-ZIEGLER, C.; UM, S.; PÉREZ, N.; BERNS, A.; MALHOWSKI, A.; YOUNG, S.** 2008. Low temperature (23 °C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 154: 148–166.
150. **WOO, J.; PALAVECINO, E.** 2013. Four-year experience with simultaneous culture and Shiga toxin testing for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in stool samples. *J Clin Microbiol* 51, 985–987.
151. **XIA, X.; MENG, J.; MCDERMOTT, P.; AYERS, S.; BLICKENSTAFF, K.; TRAN, T.; ABBOTT, J.; ZHENG, J.; ZHAO, S.** 2010. Presence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1709–1717
152. **YONG-IL, C.; KYOUNG-JIN, Y.** 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci.* 15(1):1-17

153. **ZHAO, T.** 2016. Biofilm Formation of Foodborne Pathogens and their Control in Food Processing Facilities. *J Food Microbiol Saf Hyg* Vol 1(2): 110
154. **ZWEIFEL, C.; CERNELA, N.; STEPHAN, R.** 2013. Detection of the emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11/H- sequence type 29 (ST29) clone in human patients and healthy cattle in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5411–5413.

10 ANEXO

Anexo 1. Resultados caracterización de factores de virulencia de 117 aislados STEC provenientes de Heces de Bovino.

| Muestra | cepa | Stx ₁ | Stx ₂ | HlyA | eae | | | | | | |
|---------|------|------------------|------------------|------|-----|------|----|---|---|---|---|
| A1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 73A | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| A2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 78A | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| A2 | I | 0 | 1 | 1 | 0 | 78A | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| A3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | p2-1 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| A3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | p2-1 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| A4 | VI | 1 | 1 | 1 | 0 | p2-2 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| C1 | I | 0 | 1 | 1 | 0 | p2-2 | 8 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| C4 | III | 1 | 1 | 1 | 0 | p3-5 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| C4 | VIII | 1 | 1 | 0 | 0 | p3-5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| D7 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | p3-5 | 5 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| D8 | 4 | 0 | 1 | 1 | 0 | p4-2 | 10 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| E6 | III | 1 | 1 | 1 | 0 | p5-3 | 7 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| E6 | 4 | 0 | 1 | 1 | 0 | p5-3 | 10 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| E6 | IV | 1 | 1 | 1 | 0 | p6-1 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| E6 | VII | 0 | 1 | 1 | 0 | p6-2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| E7 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | p6-2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| E7 | 4 | 0 | 1 | 1 | 0 | p6-3 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| F5 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | p6-3 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| F5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | p6-4 | 7 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| F6 | II | 1 | 0 | 0 | 0 | p6-4 | 9 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| F6 | V | 0 | 1 | 0 | 0 | p7-1 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2B | i | 1 | 0 | 0 | 0 | p7-2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2B | d | 1 | 0 | 0 | 0 | p7-2 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2B | b | 0 | 1 | 0 | 0 | p7-2 | 9 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 43B | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | p7-2 | 10 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 49x | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | p7-3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 49B | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | p7-3 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 49B | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 | p7-4 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 71A | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 | p7-4 | 10 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 71A | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | M2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 72A | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | M2 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 72A | 7 | 1 | 1 | 0 | 0 | M4 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 72A | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 | M4 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 73A | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | M9 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 73A | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | M10 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | | | | | | M10 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | | |
|------|-------|---|---|---|---|
| M13 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| M14 | 9 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| M15 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| M19 | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| M21 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| M21 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| M22 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| M29 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| M29 | 4 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| M31 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| M31 | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| M40 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| M41 | 7 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| M43 | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| M48 | 10 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| M50 | 7 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| M50 | 9 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 57B | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 73B | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 85B | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 85B | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 93A | 8 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 94A | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 99A | 10 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| P4 | 4 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| P4 | 8 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| P11 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| P34 | 1 (4) | 0 | 1 | 1 | 0 |
| P34 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P34 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P36 | 4 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| P36 | 8 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| P36 | 9 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| P37 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| P37 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 11 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 19 | 6 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 34 | 7 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 34 | 9 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| M2-3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|
| M2-3 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 57B2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 57B2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 |

1: Positivo al gen; 0: Negativo al gen

Anexo 1. Resultados caracterización de factores de virulencia de 69 aislados

STEC provenientes de Carne Molida.

| Muestra | cepa | Stx ₁ | Stx ₂ | HlyA | eae | | | | | | |
|---------|-------|------------------|------------------|------|-----|-----|------|---|---|---|---|
| 109 | 2 R | 1 | 1 | 1 | 0 | 314 | A4 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 113 | B-4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 315 | B8 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 123 | B-5 | 0 | 1 | 1 | 0 | 31 | A-8 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 123 | B-9 | 0 | 1 | 1 | 0 | 333 | A1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 125 | 9 R | 0 | 1 | 1 | 0 | 333 | A10 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 125 | A1-1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 333 | A4 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 125 | A1-2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 33 | A-8 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 127 | A-4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 346 | A1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 127 | A-6 | 0 | 1 | 0 | 0 | 346 | A3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 128 | A-4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 346 | A4 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 135 | A-5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 366 | A3 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 135 | A-8 | 1 | 1 | 1 | 0 | 36 | B-7 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 139 | A-9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 36 | B-8 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 139 | A-3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 388 | A2 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 139 | B-6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 400 | B10 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 139 | B-8 | 1 | 0 | 1 | 0 | 424 | B10 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 13 | A-6 | 0 | 1 | 0 | 0 | 46 | B-6 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 160 | 8 R | 1 | 0 | 1 | 0 | 47 | B-8 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 178 | A-8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 55 | A-3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 186 | 7 R | 0 | 1 | 1 | 0 | 5 | A3-2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 200 | A-1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 5 | D-6 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 200 | A-3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 60 | B-10 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 201 | A-9 | 0 | 1 | 1 | 0 | 62 | B-1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 210 | A1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 62 | B-10 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 210 | A2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 62 | B-5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 210 | 2-1 R | 0 | 1 | 0 | 0 | 62 | B-9 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 210 | A6 | 1 | 1 | 0 | 0 | 67 | A-10 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 210 | A8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 81 | A-3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 224 | A3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 82 | A-7 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 232 | A4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 82 | A-8 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 245 | A8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 82 | A-9 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 24 | A-1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 8 | C-3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 24 | A-2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 97 | A-5 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 260 | A2 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | | |
| 265 | B1 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | |
| 283 | A5 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | |

1: Positivo al gen; 0: Negativo al gen

Anexo 3. Presencia de genes fimbriales y autotransportadoras detectados en los 30 aislados STEC de Carne Molida.

| Aislado | Genes fimbriales | | | | Genes autotransportadores | | | | | TOTAL |
|---------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|---------------------------|-----------------|-------------|----------------|------------|-------|
| | <i>crl</i> | <i>csg</i> A | <i>csg</i> D | <i>fimH</i> | <i>ehaA</i> | <i>eha</i> B | <i>espP</i> | <i>ca</i> h | <i>flu</i> | |
| 5A-3-2 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 8 |
| 24-A-1 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 8 |
| 31-A-8 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 46-B-8 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 55-A-3 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| 62-B-1 | + | + | + | + | - | - | - | - | + | 5 |
| 81-A-3 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | 7 |
| 82-A-7 | + | + | + | + | - | - | - | - | + | 5 |
| 97-A-5 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 123B-5 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | 7 |
| 123-B-9 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | 7 |
| 127-A-4 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 128-A-4 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | 7 |
| 135-A-5 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | 7 |
| 135-A-8 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | 7 |
| 139A-3 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 6 |
| 186-7 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 200A-3 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 8 |
| 201A-9 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 8 |
| 210-2-1 | + | + | + | + | - | - | + | - | + | 6 |
| 232-A4 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 245-A8 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |

| | | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 260-A2 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | 7 |
| 283-A5 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 6 |
| 314-A4 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | 4 |
| 315-B8 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 333-A1 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 6 |
| 346-A1 | + | + | + | + | + | + | - | - | + | 7 |
| 366-A3 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 400-B10 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |

Anexo 4. Presencia de genes fimbriales y autotransportadoras detectados en los 37 aislados STEC de heces de bovino.

| Aislado | Genes fimbriales | | | | Genes autotransportadores | | | | | TOTAL |
|---------|------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|-------------|-------------|------------|------------|-------|
| | <i>crl</i> | <i>csgA</i> | <i>csgD</i> | <i>fimH</i> | <i>ehaA</i> | <i>ehaB</i> | <i>espP</i> | <i>cah</i> | <i>flu</i> | |
| 2B-i | + | - | - | - | + | + | - | + | + | 5 |
| 19-6 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 57B2-2 | + | + | + | + | + | - | + | - | - | 6 |
| 57B2-1 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| 73-B2 | + | + | + | + | + | + | - | - | + | 7 |
| 85-B1 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| 93-A8 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| 94-A4 | + | + | + | + | + | + | - | - | + | 7 |
| A2-1 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| A3-1 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| A4-VI | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| E6-4 | + | + | + | + | + | - | + | - | - | 6 |
| E6-III | + | + | + | + | + | - | + | + | - | 7 |
| E6-IV | + | + | + | + | + | - | + | - | - | 6 |
| E7-2 | + | + | + | + | + | - | + | - | - | 6 |
| M2-3-1 | + | + | + | + | + | - | + | - | - | 6 |
| M4-1 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | 5 |
| M9-3 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| M10-2 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 6 |
| M10-3 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 6 |
| M15-3 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 8 |

| | | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M21-1 | + | + | + | + | + | - | + | - | - | 6 |
| M21-2 | + | + | + | + | + | - | + | - | - | 6 |
| M22-1 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| M29-4 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 8 |
| M41-7 | + | + | + | - | + | - | + | - | + | 6 |
| P2-2-8 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 8 |
| P3-5-5 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| P4-1 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | 7 |
| p4-2-10 | + | + | + | + | + | + | - | - | + | 7 |
| p5-3-10 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| P6-2-1 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | 6 |
| P6-3-3 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| P6-3-7 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 6 |
| P6-4-7 | + | + | + | + | + | + | - | - | + | 7 |
| P37-1 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 8 |
| P37-5 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 8 |

Anexo 5. Porcentaje de identidad por alelo de las secuencias de los aislados STEC encontrados para el gen *crI*.

| Alelos | Aislados | Identidad (%) | Longitud del gen | Longitud de la secuencia |
|---------------|---|----------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1 | M9-3 | 97,26 | 402 | 402 |
| 2 | 2B-i | 98,26 | 402 | 402 |
| 3 | 19-6/ 57B2-1/ 57B2-2/ 81A3/ 123B5/ 123B9/ 128A4/ 135A5/ 135A8/260A2/ p4-2-10/ M22-1 | 99,00 | 402 | 402 |
| 4 | 232A4/ 201A9/ 200A3/ 127A4/ 31A8/ 24A1 | 99,00 | 402 | 402 |
| 5 | p6-4-7/ p6-3-7/ p6-3-3/ p3-5-5/ 346A1/ 94A4/ 85B1/ 55A3/ 5A32 | 99,00 | 402 | 402 |
| 6 | 283A5 | 99,25 | 402 | 402 |
| 7 | P4-1/ M41-7/ M21-1/M21-2/ M2-3-1/ E7-2/ E6-IV/ E6-III/ E6-4/ A3-1/ A2-1/ 400B10/ 366A3/ 315B8/ 210-2-1/ 186-7/ 97A5/ 93A8/ 46B8 | 99,50 | 402 | 402 |
| 8 | 62B1/ 73B2/ 82A7/ 139A3/ 245A8/ 314A4/ 333A1/ P37-1/ P37-5/ p5-3-10/ p2-2-8/ M29-4/ M15-3/ M10-3/ M10-2/ M4-1/ p6-2-1 | 99,75 | 402 | 402 |

Anexo 6. Porcentaje de identidad por alelo de las secuencias de los aislados STEC encontrados para el gen *csgA*.

| Alelos | Aislados | Identidad (%) | Longitud del gen | Longitud de la secuencia |
|---------------|---|----------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1 | E7-2/ E6-IV/ E6-4 | 99,56 | 456 | 456 |
| 2 | M9-3 | 98,26 | 459 | 456 |
| 3 | E6-III | 98,9 | 456 | 456 |
| 4 | 283A5 | 99,12 | 453 | 456 |
| 5 | 19-6/ 57B2-1/ 57B2-2/ 81A3/ 123B5/ 123B9/ | 100 | 456 | 456 |

128A4/ 135A5/ 135A8/260A2/ p4-2-10/ M22-1/
 232A4/ 201A9/ 200A3/ 127A4/ 31A8/ 24A1/
 p6-4-7/ p6-3-7/ p6-3-3/ p3-5-5/ 346A1/ 94A4/
 85B1/ 55A3/ 5A32/ P4-1/ M41-7/ M21-1/M21-
 2/ M2-3-1/ A3-1/ A2-1/ 400B10/ 366A3/
 315B8/ 210-2-1/ 186-7/ 97A5/ 93A8/ 46B8/
 62B1/ 73B2/ 82A7/ 139A3/ 245A8/ 314A4/
 333A1/ P37-1/ P37-5/ p5-3-10/ p2-2-8/ M29-4/
 M15-3/ M10-3/ M10-2/ M4-1/ p6-2-1

**Anexo 7. Porcentaje de identidad por alelo de las secuencias de los aislados
 STEC encontrados para el gen *csgD*.**

| Alelos | Aislados | Identidad (%) | Longitud del gen | Longitud de la secuencia |
|--------|--|---------------|------------------|--------------------------|
| 1 | E7-2/ E6-IV/ E6-4 | 99,39 | 651 | 651 |
| 2 | M9-3 | 99,39 | 651 | 651 |
| 3 | E6-III | 99,08 | 651 | 651 |
| 4 | p2-2-8 | 98,46 | 651 | 651 |
| 5 | 19-6/ 57B2-1/ 57B2-2/ 81A3/ 123B5/ 123B9/ 128A4/ 135A5/ 135A8/260A2/ p4-2-10/ M22-1/ 232A4/ 201A9/ 200A3/ 127A4/ 31A8/ 24A1/ p6-4-7/ p6-3-7/ p6-3-3/ p3-5-5/ 346A1/ 94A4/ 85B1/ 55A3/ 5A32/ P4-1/ M41-7/ M21-1/M21- 2/ M2-3-1/ A3-1/ A2-1/ 400B10/ 366A3/ 315B8/ 210-2-1/ 186-7/ 97A5/ 93A8/ 46B8/ 62B1/ 73B2/ 82A7/ 139A3/ 245A8/ 314A4/ 333A1/ P37-1/ P37-5/ p5-3-10/ 283A5/ M29-4/ M15-3/ M10-3/ M10-2/ M4-1/ p6-2-1 | 98,62 | 651 | 651 |

Anexo 8. Porcentaje de identidad por alelo de las secuencias de los aislados STEC encontrados para el gen fimH.

| Alelos | Aislados | Identidad (%) | Longitud del gen | Longitud de la secuencia |
|---------------|--|----------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1 | 62B1/ 82A7/ 210-2-1/ 314A4 | 98,45 | 903 | 903 |
| 2 | M9-3 | 98,34 | 903 | 903 |
| 3 | 19-6 | 98,89 | 903 | 903 |
| 4 | E6-III | 99,89 | 903 | 903 |
| 5 | p2-2-8 | 100 | 903 | 903 |
| 6 | E6-4/ E7-2/ E6-IV | 99,22 | 903 | 903 |
| 7 | 5A3-2 | 98,34 | 903 | 903 |
| 8 | P37-1/P37-5/ M29-4/ M4-1/ 135A5/ 135A8/ 123B5/123B9/ p4-2-10/ M15- 3/ 57B2-1/ 57B2-2/ M22-1/ 283A5/ 128A4/ 81A3/ 46B8/ 24A1 | 98,56 | 903 | 903 |
| 9 | 400B10 | 98,45 | 903 | 903 |
| 10 | 260A2 | 98,45 | 903 | 903 |
| 11 | p6-4-7 | 98,89 | 903 | 903 |
| 12 | P6-2-1/ P4-1/ M21-1/ M21-2/ M10-3/ M10-2/ M2-3-1/ A3-1/ A2-1/ 333A1/ 315B8/ 186-7 | 98,78 | 903 | 903 |
| 13 | 139A3 | 98,56 | 903 | 903 |
| 14 | 97A5/ 366A3 | 98,67 | 903 | 903 |
| 15 | 93A8 | 98,56 | 903 | 903 |
| 16 | P6-3-7/ P6-3-3/ P3-5-5/ A4VI/ 346A1/ 232A4/ 127A4/ 94A4/ 85B1/ 55A3/ 31A8 | 98,89 | 903 | 903 |
| 17 | 201A9/ 200A3 | 98,78 | 903 | 903 |
| 18 | p5-3-10/ 73B2/ 245A8 | 99,34 | 903 | 903 |

Anexo 9. Porcentaje de identidad por alelo de las secuencias de los aislados STEC encontrados para el gen *cah*.

| Alelos | Aislados | Identidad (%) | Longitud del gen | Longitud de la secuencia |
|---------------|-----------------|----------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1 | E6-III | 98,54 | 3,018 | 3,018 |
| 2 | 19-06 | 99,97 | 3,018 | 3,018 |

Anexo 10. Secuencias consenso de genes fimbriales y autotransportadores utilizadas para alineamiento con secuencia nucleotídica de los genomas de aislados STEC.

| Gen | Secuencia consenso |
|--------------------|--|
| <i>crl</i> | <p>ATGACGTTACCGAGTGGACACCCGAAGAGCAGATTGATCAAAAAATTTACCGCACTAGGCC CGTATATTCGTGAAGTAAGTGCGAAGATAATCGATTCTTTTTCGATTGTCTGGCTGTATGC GTCAACGTGAAACCGGCACCGGAAGTGCCTGAGTTCTGGGGCTGGTGGATGGARCTGGA AGCGCAGGAATCCCGTTTTACTACAGTTACCAGTTTGGTCTGTTGATAAAGCAGGCGAC TGGAMGAGTGTTCCGGTAAAAGATACTGAAGTGGTTGAACGACTGGAGCACACCCTGCGT GAGTTTCACGAGAAGCTGCGTGARCTGCTGRCGACGCTGAATCTGAAGCTGGAACCGGCG GATGATTTTCGTGAYGARCCGGTGAAGTTAACGGCGTGA</p> |
| <i>csgA</i> | <p>ATGAAACTTTTAAAAGTAGCAGCAATTGCAGCAATCGTATTCTCCGGTAGCGCTCTGGCAG GTGTTGTTCTCAGTACGGCGGCGGCGTAACCACGGTGGTGGCGGTAATAATAGCGGCC CAAATTCAGAGCTGAACATTTACCAGTACGGTGGCGGTAACCTGCACTTGCTCTGCAA ACTGATGCCCGTAACTCTGACTTGACTATTACCCAGCATGGCGGCGGTAATGGTGCAGATGTTG GTCAGGGCTCAGATGACAGCTCAATCGATCTGACCCAACGTGGCTTCGGTAACAGCGCTAC TCTTGATCAGTGGAACGGCAAAAATTCTGAAATGACTGTTAAACAGTTCCGGTGGTGGCAAC GGTGCTGCAGTTGACCAGACTGCATCTAACTCCTCCGTCAACGTGACTCAGGTTGGCTTTG GTAACAACGCGACCGCTCATCAGTACTAA</p> |
| <i>csgD</i> | <p>ATGTTTAAATGAAGTCCATAGTATTCATGGTCATACATTATTGTTGATCACTAAACCTTCTTTG CAGGCGACAGCTCTCTTGCAGCACCTTAAACAATCGCTGGCAATTACAGGAAAATTACATA ATATTCAACGTTCTCTGGACGATATCTCTTCAGGCTCTATTATTCTTCTGGATATGATGGAAG CGGATAAAAAGCTTATCCATTATTGGCAGGATACTTTGAGCAGGAAAAACAATATCAA AATATTGTTGCTAAATACGCCTGAAGATTACCCGTACCGCGACATTGAAACTGGCCTCATA TCAACGGCGTTTTTTATGCCATGGAGGATCAAGAACGTGTTGTCAATGGGTTGCAAGGCGT CCTGCGCGGCGAATGCTACTTTACGCAAAGCTTGCCAGCTACCTGATTACGCATTCAGGT AACTATCGTTATAACAGCACGGAATCAGCCCTTACTCATCGGGAAAAAGAGATCCTGA ATAAGCTGCGTATCGGCGCGTCTAATAACGAGATCGCTCGTTGTTGTTTCATCAGCGAAAA TACGGTTAAAACGCATCTTTATAATCTTTTCAAGAAGATAGCCGTAAAAAACCGGACACAA GCGGTTTCTGGGCAAACGATAACCTCAGGCGATAA</p> |
| <i>fimH</i> | <p>ATGAAACGAGTTATTACCCTGTTTGCTGTAAGTCTGATGGGCTGGTCCGGTAAATGCCTGGT CATTGCGCTGAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGT TTATGTAAACCTTGCGCCYGYCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTTCGACG CAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGG CTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGC TATCCATTTCTACCACCAGCGAAACGCCGCGGTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCC</p> |

| | |
|------------|--|
| | <p>GTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGCGGGGTGGCGATTAAGC TGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGGCAGACACCAACAATAACAGCGATGATTTCC AGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGYGATGT TTCTGCTCGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCRATTCTCTTAC CGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCG GGCAACTCGATTTTCACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTT GACGCGCAACGGTACGATTATTCCAGCGAATAACACGGTATCGTTAGGAGCAGTAGGGAC TTCGGCGGTRAGTCTGGGATTAACGGCAAATTATGCACGTACCGGAGGGCAGGTGACTGC AGGGAATGTGCAATCGATTATTGGCGTGACTTTTGTATCAATAA</p> |
| cah | <p>ATGCAGAACGGAATTGCACACAACAGACTGATACTTCTCTGTCTGATGAAGGGGGAGAGC GTTTACGCCCCGGGACGTATCGCTGTGCCCGATAACTCTGTTTTGTACCTGCCGGTATCCACT TTTGTGGGTACCGGCTTTTTTATTACCCTCTGTAAGGAAAAGCTGATGAAACGACATCTGA ACACCAGCTACAGGCTGGTATGGAATCACATTACGGGCACCCTGGTGGTGGCCTCCGA GGCCCGCTCACGGGGAAAACGCGCCGGTGTGGCGGTTGCGCTGTCTTTGCTGCTGTAC ATCAGTCCCGGCACTGGCTGCTGACAAGGTTGTACAGGCGGGAGAAAACCGTGAACGATGG AACACTGACAAATCATGACAACAGATTGTCTTCGGTACGGCCAACGGAATGACCATCAGT ACCGGGCTGGAACGGGGCCGGACAGTGAAGAAAACACCGGTGGGCAATGGATACAGAA TGGCGGGATAGCCGAAACACCACTGTCAACCAAATGGTCGTCAGGTCGTGCTGGAGGG GGGAACAGCCAGTGATACGTTATTCGTGACGGCGGGGGACAGAGCCTGAACGGACTGG CGGTGAACACCACACTGAATAACAGAGGCGAGCAGTGGGTGCATGAGGGCGGGGTTGCC ACCGGTACAATTATCAACCGGACGGTTACCAGAGCGTTAAAAGTGGCGGGCTGGCAACA GGAACCATCATCAACACCGGCGCAGAAGGCGGCCCTGATTCTGACAACCTCGTATACGGGTC AGAAGTCCAGGGAACAGCAGAATCCACCACCATCAACAAAATGGACGGCAGATTATCT TATTTCCGGGCTAGCCCGTGACACTCTCATTTACGCAGGTGGTGACCAGTCGGTACACGG AAGGGCCCTGAATACCACACTGAATGGCGTTACCAATATGTGCACAGGGACGGACTTGC GCTGAACACGGTAATTAACGAGGGGGGCTGGCAGGTTGTTAAGGCAGGTGGCGCTGCCG GTAACACCACCATAAATCAGAACGGTGAACCTGAGGGTACATGCCGGCGGGGAAGCCACTG CAGTACCCAGAACACGGGCGGTGCACTGGTTACCAGTACTGCTGCAACTGTCATCGGCAC AAACCGTCTGGGAATTTACGGTGGAAAACGGTAAGGCTGACGGTGTGTTCTGGAATC CGGCGTCTGCTGGATGTACTGGAGAGCCATTACAGCACAGAATACCCTAGTGGATGACGG CGGTACCCTGGCAGTGTCTGCCGGCGGTAAGGCGACAAGTGTACCATAACATCCGGTGG TGCCCTGATTGCAGACAGTGGTGCCACTGTTGAGGGGACCAATGCCAGCGGTAAGTTTACG TATTGATGGCACATCCGGTCAGGCCAGCGCCTGCTGCTGGAAAATGGCGGCAGCTTTAC GGTTAATGCCGGGGGACAGGCTGGCAACACCACTGTCGGACATCGTGGAACTGACGCT GGCTGCCGGGGGAAGTCTGAGTGGCAGAACACAGCTCAGTAAAGGCGCCAGTATGGTACT GAATGGTGTGTTGTCAGTACCGGCGATATTGTTAACGCAGGGGAGATTTCGTTTGATAAT CAGACGACACCGAATGCCGCGCTGAGCCGTGCTGTTGCAAAAAGTAACTCCCCGGTAACGT TCCATAAATGACCACCACGAACCTCACCGGCCAGGGCGGCACCATCAATATGCGTGTTCG CCTTGATGGCAGCAATGCCTCTGACCAGCTGGTATTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG ACCTGGCTTTCGTTTACAATGTGCGAAACAGCAACCTCGGGGTGGCAACACCGGACAG GGTATCCGGGTTGTGGATGCACAGAATGGCGCCACCACAGAAGAAGGTGCGTTTGCCTG</p> |

| | |
|-------------|--|
| | <p>AGTCGCCGCTTCAGGCCGGCGCCTTTAACTACACCCTGAACCGTGACAGCGATGAAGACT GGTACCTGCGCAGTGAAAATGCTTATCGTGCTGAAGTCCCCCTGTATACATCCATGTTGACA CAGGCAATGGACTATGACCGGATTCTGGCAGGCTCCCGCAGCCATCAGACCGGTGTAAC GGTGAAAATAACAGCGTCCGTCTCAGCATTAGGGCGGTTCATCTCGGTCACGATAACAACG GCGGTATTGCCCGTGGAGCCACGCCGAAAGCAGCGGCAGCTATGGCTTCGTCCGTCTGG AGGGTGACCTGCTCAGAACAGAGGTTGCCGGTATGTCTCTGACGACAGGGGTGTATGGTG CTGCAGGCCATTCTCCGTTGATGTTAAGGATGATGACGGTTCGCGCCGGCACGGTCCG GGATGATGCCGGCAGTCTGGGCGGATACCTGAATCTGGTACACACATCCTCCGGCCTGTGG GCTGACATTGTGGCCAGGGAACCCGTCACAGCATGAAAGCGTCATCGGACAATAACGAC TTCCGCGCCCGGGGCTGGGGCTGGCTGGGCTACTGGAAACCGGTCTGCCCTCAGTATCA CTGACAATCTGATGCTGGAGCCACAACACTGCAGTACACCTGGCAGGGACTCTCCCTGGATGA CGGCCAGGATAACGCCGTTATGTGAAGTTCCGGGCATGGCAGTGCAACATGTGCGTGC CGGTTTCCGTCTGGGCAGCCACAACGATATGACCTTTGGTGAAGGCACCTCATCCCGTGAC ACCCTGCGCGACAGTGCAAAACACAGTGTGAGTGAAGTCCCGGTGAAGTGGTGGGTACAG CCTTCTGTTATCCGCACCTCAGCTCCCGGGGTGACATGAGCATGGGGACAGCCGCAGCCG GCAGTAACATGACGTTCTCACCGTCCCGGAATGGCACGTCAGTGGACCTGCAGGCCGGACT GGAAGCCCGTATCCGGGAAAATATCACCTGGGCGTTCAGGCCGTTATGCCACAGCGTC AGCGGCAGCAGCGCTGAAGGCTATAACGGTCAGGCTACGCTGAATATGACTTTCTGA</p> |
| ehaA | <p>ATGGCATTAAATGCGTTGCTGTTTATGCAATCTTGGTTTTATTTGGATGTATTGCTGGAGATT GTGATGAATAAAATATATCGGCTAAAGTGGAAACAGGTCCCGTAACTGTTGGAGCGTCTGCT CGGAGCTGGGGAGCAGAGTAAAAGGAAAAAAGTCCCGGGCTGTTTTAATTAGCGCGATAA GTTTATATTCATCTCTGGTATTCGCCGATGATGTCATCGTAAACCAGGATAAACTATTGAT TTTGCAAAGAGAACCAGAGCATCGATTACCGTATTACGGTGACAGACAATGCCAATCTGG TAATCAATGCGACAGATACTTCCCGTCCGCGTCTGACTCTCGCTTCTGGTGGTGGGTTGGAT ATTACCGGAGGAAAGGTAACAATCAATGGCCCACTTAACTTTTTGCTGAAAGGTACGGGGT TCCTGAATGTCTCCAATGCTGGCAGCGAGTTATATGCTGATGATTTGTATGAATCAAACA GGCATGAGACACGATCGCGGCTATTTAATGTCTCCAACGGCGGCAAAATCCATGTTAAGG GCACCAGCCGTCTGACCTATTTGCAGGGAAATGTCAGTGGTGAAGGTAGCCAGGTAAATTC CGAAACCTTCTTTATGGGCGTTTACGGCAGTTACGGTGGTAATCAGTACCTGTCAGTTAATA ACGGCGGTGAAGTTAATGCCAGGAAGCAAATTAGCCTGGGCTATTATGATCAAGTCTCCGA TACAACACTTGCTGTTTCGGAAGGTGGTAAAATTTCTGCGCCTACTATTAGTTTAAGCACCA ACTCTGAGTTAGCGTTAGGGGCACAGGAAGGAAGCGCAGCGAAGGCAGCAGGGATTATT GATGCCGAAAAAATTGAGTTTGTGTGGCAAAGACATCCGAGAAGAAAATCACCTTAAAC CACACGGATAAAGACGCGACTATTTCCGCGGATATTGTCAGTGGCAGCGAGGGCCTGGGC TATATCAATGCGCTCAATGGCACGACTTACTTAAACCGGTGATAACTCTGCCTTTAGTGGTAA AGTCAAAATTGAGCAAAATGGCGCTTTAGGGATCACCCAAAATATAGGTACAGCAGAGAT CAACAACCGCGGGAAATTACACCTGAAGGCTGACGATAGCATGACCTTTGCCAATAAGATC TCTGGCAACGGTACAATAAGTATCGACAGTGGGACGGTGGAGTTGACCGGCAATAACTAT GCATTACGCGGATATATTGATGTTGCTTCTGGTGCTGTGCTGTTATTTCTGAAGACAAGAA TATCGGTGCTGCAGAGCTGGATGTCGATGGCAAATTGCAAATTAATGCCAACAAGATTGG GTATTTGATAACGATCTTGAAGGTAGAGGCATTGTTGAAATAAACATGGGGAATCACGAAT</p> |

TCTCCTTCGATGAGTTTGCTTATACAGACTGGTTCCAGGGTTCCTGCGTTCAGAACACG
ACATTTAATCTGGAAAAGAATGCTGAGTTTCTGCAGAAAGGCGGGATCACTGCGGGTCAG
GGAAGCCTGGTAACAGTGGGTAAGGGCGCTCACTCCATTAGCACTTTGGGATTCTCCGGCG
GAACCGTTGATTTTGGTGCCCTGACAGCAGGTGCACAGATGACAGAAGGGACGGTCAACG
TTAGTAAAACGCTGGATTTGCGCGGCGAGGGTGTGATTCAGGTTTCTGACAGTGACGTTGT
CCGCTCAGTATCTCGTGATATTGACTCTGCGTTATCGCTCACTGAAGTCGATGATGGTAACA
GCACCATTAAGTTGGTTGATGCGCAAGGTGCGGAAGTTCTGGGCGATGCGGGCAATCTGC
AATTGCAGGATAAAAATGGGCAAATCCTCTCCAGCAGCGCCAACGTGATATTCAGCAGAA
TGGGCAAAAAGCGGCCGTCGGCACTTACGACTATCGTCTGACGAGTGGGGTAAACAATGA
CGGTCTGTATATTGGTTACGGCCTGACCCAGCTTGATTTACACGCTACCGACAGCGATGCTC
TGGTGCTGAGCTCTAACGGTAAAAGCGAGAATGCCGCCGATCTCAGCGCAAAGATTACCG
GCAGTGGTGACCTGGCATTACAGCAGCCAGAAGGGTCAGACCGTATCGCTTTCTAACAAAG
ACAACGACTATACCGGTGTACCGATCTGCGCAGTGGGACGCTTTTGTGAATAACGATAA
CGTGTTGGGTAATACCCATGAAGTGCCTGCTGGCGGCAGAGACTGAAGTGGACATGAATGG
TCACAGCCAGACCGTGGGCACGCTCAATGGCAGCGCCGATTCACTGCTGAGCTTAAATGGC
GGCAGTCTGACGGTTACCAACGGGGCACTTCAACCGGTTCTGTTAACGGGGAGCGGAGAG
CTGAATATTCAGGGCGGCACGCTGGACATCGCGGGCGATAACAGCAACCTGACGGCGAAT
GTGAACATTGCTAATTCGGCTAATGTCTGGTAAGTCATGCGCAGGGATTGGGTAGCGCAA
ACGTTGAGAACAACGGTACCCTGGCGTTGAATAATAGCGCTGAAAAAGAGCGGCTGCGT
CTGTGAATTACGCCCTGGGCGGCAATCTGACCAACAACGGTACGCTGATGACCGGAATGTC
AGGACAGCAAGCTGGCAATGTGTTAGTGGTGAAGGGGAAGTACCACGGTAATAACGGTCA
ACTAGTAATGAATACGGTACTGAATGGCGATGACTCAGTAACCGATAAATTGGTTGTCGAG
GGCGATACTAGCGGCACGACTGCCGTTACGGTGAATAACGCTGGCGGTACAGGTGCGAAA
ACCCTTAACGGTATCGAAGTATCCATGTAGACGGTAAGTCTGAGGGCGAATTTGTTCAAG
CTGGGCGTATCGTTGCGGGGGCGTATGACTACACTCTCGCGCTGGACAAGGGGCAAATA
GTGGTAACTGGTATCTGACCAGCGGCAGTGATTCTCCTGAACTGCAGCCGGAGCCAGACCC
GATGCCGAATCCAGAGCCAAACCCGAATCCAGAGCCGAACCCTAACCCGACACCTACGCCG
GGTCCGGATCTGAATGTGGATAATGACCTGCGACCCGAGGGCGGGTAGCTACATTGCGAAC
CTTGACAGCAGCAATACCATGTTACCACGCGTCTGCATGAGCGTCTGGGTAATACGTAAT
ATACCGACATGGTGACGGGTGAGCAGAAACAACCACTATGTGGATGCGCCATGAAGGTG
GTCATAATAAATGGCGTGATGGCAGCGGCCAGCTGAAAACCCAAAGCAATCGCTATGTTCT
GCAACTGGGAGGCGATGTCGCGCAGTGGAGCCAAAACGGCAGCGACCGCTGGCATGTTG
GGGTCATGGCGGGATATGGCAACAGCGACAGCAAAAACCATTTCTCGCAACCGGTTATC
GTGCAAAAAGCGAGTGTGAACGGATATAGCACAGGCCTCTATGCCACCTGGTATGCCGATG
ACGAGTCGCGTAATGGCGCGTATCTCGACAGTTGGGCGCAGTACAGCTGGTTTGATAACAC
AGTGAAAGGGGATGACTTACAAAGTGAATCCTATAAATCAAAGGATTTACCGCTTCACTG
GAAGCTGGATACAAACACAAATTAGCTGAATTTAATGGCAGCCAGGGAACCGGTAATGAA
TGGTATGTTCAAGCCGAAGCACAGGTTACCTGGATGGGAGTCAAAGCCGATAAGCACCGC
GAAAGCAACGGAACCCCTCGTTCATAGCAACGGTGTGGAATGTTCAAACCCGACTTGGC
GTAAAAACCTGGCTGAAGAGCCACCATAAAATGGATGACGGTAAATCCCGCGAGTTCCAG
CCGTTTGTAGAAGTGAAGTGGCTACATAACAGTAAGGATTTACAGCACCGATGGATGGCG
TGTCTGCTCACTCAGGATGGAGCCCGAAATATTGCTGAGATAAAAACCGGGGTGGAAGGAC

| | |
|--------------------|---|
| | AGCTAAATGCCAACCTGAATGTCTGGGGGAATGTGGGCGTTCAGGTTGCCGATAGGGGAT ATAATGACACCTCTGCAATGGTTGGCATTAAAGTGGCAATTCTGA |
| <i>ehaB</i> | ATGCACTCCTGGAAAAAGAACTTATAGTATCACAATTAGCATTGGCTTGCACTCTGGCTAT CACCTCTCAGGCTAATGCAGCGACCAATGATATTTCTGGTCAAACCTACAATACTTTCCATC ACTACAACGACGCCACCTATGCTGATGACGTTTACTATGATGGTTATGTAGGCTGGAACAA CTATGCCGCTGATAGCTATTACAACGGCGATATCTACCCGGTCATTAATAACGCTACCGTTA ACGGCGTGATTTCTACCTACTATCTGGACGACGGTATTTCTACCAATACCAACGCCAATAGT CTGACAATCAAAAACAGCACTATTCACGGTATGATTACCTCTGAGTGCATGACTACTGATTG TGCTGATGACCGTGCTACTGGTTATGTTTATGATCGTCTGACACTGAGCGTTGATAATTCAA CGATCGATGACAACTACGAGCATTATACTTACAACGGTACCTATAATAATGCCGCTGACACT CATGTTGTAGATGTTTACGATATGGGTACTGCTATTACACTGGATCAGGAAGTTGATCTGTC CATCACTAATAACTCTCATGTAGCAGGTATTACGCTGACTCAGGGTTATGAGTGGGAAGAT ATTGACGACAACACAGTCAGCACTGGCGTAAACAGCAGCGAAGTGTTTAATAACACTATTA CTGTTAAAGATTCTACTGTGACCTCTGGTTCATGGACTGATGAAGGTAATACTGTTGGTTT GGCCATACTGGTAATGCCAGCAACTATAGCAACACGCTGACTGCAGACGATGTTGCAATTG CCGCAATCGCAAATCCGTATGCTGATAATGCGATGCAGACTACAGTAACTTTAGACAACCTC AACACTGATGGGTGATGTTGTTTTCTCCAGTAATTTGATGAAAACCTCTTCCCAGGTTG CTAACAGCTATCGCGATGCTGATGGTGATGTAGATAACCAACGGTTGGGATGGCACAGACC GTATGGATGTGACTCTGAACAACGGCAGCAAGTGGGTTGGCGCTGCAATGTCTGTTTCATAT GGTTGATGAAGATGGTGATGGTCTTACGACGGATATGCTGTTGGTACTGAAGCAACTGCA ACTCTGCTCGATATTGCAGCTAACAGCCTGTGGCCTTCATCAACTGTGCGTGTGATAACAT CAATACTCAATATGACGAAAATGGCCATATCGTAGGAAACGAAGTTTACCAGAGCGGTTTG TTAATGTGACTTTGAACGGTGGTTCAGAGTGGGATACAACAAAATCTTCTCTGATTGATAC TTAAGTATTAACAGCGGTTCCCAAGTTAATGTTGCAGACTCTCGTCTGATCTCTGACACTG TCTCTCTGACTGGCGGTTCTAACCTGAACATCGGTGAAGACGGTCATGTAGCGACTAATAC CCTGACCATCGACAATAGTACCGTTAAAATGTCTGATGATGTTTCTGCGGGCTGGGGTTTA GAAGATGCTGCACTGTACGCAAATACCATCACCGTAACTAACGACGGTCTGTTGGATATTA ACGTTGATCAGTTTCGATGCTAACCCGTTCCAGGCCGATACCCTGAATCTGACCAGTACCACT GATACTAACGGCAACATTCACGCTGGTGTATTTCGATATCCATAGCAGTGATTACGTAATGG ATACCGATCTGGTCAACGATCGTACCAACGATACTACCAAGTCAAACCTACGGTTATGGCTTA ATCGCAATGAACTCTGATGGTCACCTGACTATTAACGGTAACGGCGATAACGACAACACTG CTTCTATCGAAGCTGGTCAGAACGAAGTTGATAACAACGGTGACCATGTTGCAGCCGCGAC CGGTAAC TACAAAGTTCGATCGACAACGCTACTGGTCTGTTCTATCGCTGACTACAAC GGCAACGAGCTGATCTACGTCAACGACAAAAACAGCAACGCGACCTTCTCTGCTGCTAACA AAGCTGACCTGGGTGCATACACCTATCAGGCTGAACAGCGCGGTAACACCGTTGTTCTGCA ACAGATGGAGTTGACCGACTACGCTAACATGGCGCTGAGCATCCCATCTGCGAACACCAAT ATCTGGAACCTGGAACAAGACACCGTTGGTACTCGTTTGACCAACTCTCGTCATGGCCTGG CTGATAACGGCGGCGCATGGGTAAGCTACTTCGGTGGTAACTTCAACGGCGACAACGGCA CCATCAACTATGATCAGGATGTTAACGGCATCATGGTCGGTGTGATACCAAAATTGACGG TAACAACGCTAAGTGGATCGTCGGTGCAGGCTCGCTAAAGGTGACATGAATGA CCGTTCTGGTCAGGTGGATCAAGACAGCCAGACTGCCTACATCTACTCTTCTGCTCACTTCG |

| | |
|-------------|---|
| | <p>CGAACAAACGTCTTTGTTGATGGTAGCTTGAGCTACTCTCACTTCAACAACGACCTGTCTGCA ACCATGAGCAACGGTACTTACGTTGACGGTAGCACCAACTCCGACGCTTGGGGCTTCGGTT TGAAAGCCGGTTACGACTTCAAAGTGGGTGATGCTGGTTACGTGACTCCTTACGSCAGCAT TTCTGGTCTGTTCCAGTCTGGTGTGACTACCAGCTGAGCAACGACATGAAAGTTGACGGT CAGTCTTACGACAGCATGCGTTATGAACTGGGTGTAGATGCAGTTATACCTTCACCTACA GCGAAGATCAGGCTCTGACTCCGTACTTCAAAGTGGCTTACGTCTACGACGACTCTAACAAC GATAACGATGTGAACGGTGATTCCATCGATAACGGTACTGAAGGGTCTGCGGTACGTGTT GGTCTGGGTACTCAGTTCAGCTTCACCAAGAACTTCAGCGCCTATACCGATGCTAACTACCT CGGTGGTGGTGACGTAGATCAAGACTGGTCCGCGAACGTGGGTGTTAAATATACCTGGTA A</p> |
| espP | <p>ATGAATAAAATATACTCTCTTAAATACAGCCATATTACAGGAGGGTTAATCGCTGTTTCTGA ATTATCCGGCAGAGTATCATCAAGAGCAACTGGTAAGAAAAACACAAACGCATACTTGCA TTATGTTTTTTAGGCTTATTACAATCCTCATATTCTTTTGCCTCACAGATGGATATTTCAAATT TCTACATCCGTGACTATATGGATTTTGCACAGAACAAGGGCATATTTTCAGGCTGGCGCAAC AAATATTGAAATAGTGAAGAAAGATGGCTCCACCCTGAAACTACCGGAAGTACCATTTCT GACTTCTACCGGTTGCAAAACAAGGGTCAACCACATCTATTGGTGGTGCATACAGTATCA CAGCCACACACAATACGAAAACCACCACTCAGTTGCGACGCAAACTGGGGGAACAGCA CGTACAAAACAACTGACTGGAATACTTCACATCCTGATTTTGCAGTATCCCGACTTGACAAG TTTGTGTTGAGACCCGAGGTGCGACTGAAGGCGCAGATATTTGTTATCAAAACAGCAGG CACTTGAACGTTACGGGGTTAATTATAAAGGAGAAAAGAACTTATCGCATTACAGAGCCGG CTCTGGTGTGGTATCCGTTAAAAAAATGGACGCATAACTCCATTTAATGAGGTTTCTTATA AGCCAGAAATGTTAAATGGCTCTTTCGTTACATTGATGACTGGAGTGGATGGCTGATATT AACCAACAACCAGTTTGTGAGTTAATAACATTGCCTCTCAGGGTGACAGCGGTTACAGCA CTGTTGCTCTATGATAACCAAAAGAAAAAGTGGGTTGTCGCTGGAAGTGTCTGGGGGATTT ATAATTACGCCAATGGCAAAAACCACGCAGCATAACAGTAAATGGAACCAGACAACCATTGA CAACCTGAAGAACAAGTATTCTTACAACGTGGATATGTCAGGRGCTCAGGTTGCAACCATT GAAAATGGAAAACGACAGGCACTGGCTCAGACACCACCGATATAAAAAATAAGGACTTA ATATTTACTGGCGGTGGAGATATCCTCCTGAAATCCTCTTTTGATAATGGTGTCTGGCGGTCT TGTCTTTAATGATAAAAAGACCTATCGAGTAAACGGGGATGATTTACCTTTAAAGGTGCC GGTGTGATAACAAGAACGGCAGCACCGTTGAGTGGAAATATCCGGTATGATAATAAAGAC AACCTTCACAAAATTGGTGTGACACATTAGATGTCCGAAAAACCCAGAACACCAACCTGA AAACAGGTGAGGGTCTTGTCACTTCTGGAGCTGAAAAACATTCAATAATATCTACATAAC CAGTGGTGTGGAAGTGTCCGACTGAATGCAGAAAATGCACTGTCTGGCGGTGAATACAA CGGTATTTTCTTTCGCAAAAATGGCGGAACTCTTGACCTGAACGGATATAATCAGTCTTTCA ATAAAATTGCTGCAACTGATTCAGGTGCTGTAATAACCAATACGTCAACCAAAAAATCCATT TTATCCCTGAATAATACTGCTGACTATATCTATCACGGYACATAAACGGGAATCTGGACGT ACTTCAGCATCATGAGACGAAAAAGAGAACCCTCGTCTTATTCTTGATGGGGCGTGGAC ACAACAAATGATATAAGCCTGCGTAATACAACTGTCCATGCAGGGACATGCCACTGAAC ATGCCATTTATCGGGATGGAGCTTTCTCTTGTCTACTACCAGCTCCTATGCGCTTTTTGTGTG GCAGTGATTATGTTGCAGGAATGCAAAATACAGAAAGCTGATGCTGTAACCAAAACGGAA ATGCCTATAAAACCAACAATGCTGTCTCTGATTTATCGCAGCCAGACTGGGAACCGGAAC</p> |

| | |
|------------|---|
| | <p> ATTCAGATTTGGAACGCTACATCTTGAAAATTCCGATTTTTCTGTTGGTCGTAATGCAAATG TAATCGGGGACATTCAGGCCAGTAAATCAAACATTACTATTGGTGACACTACAGCATATATT GATTTGCATGCTGGTAAAAATATTACCGGTGATGGTTTTGGCTTCCGCCAGAATATTGTGCG TGGAAACTCACAAGGAGAAAACGCTGTTTACAGGAGGGATCACAGCAGAAGACAGCACTAT CGTTATTAAGATAAAGCAAAGCATTATTTCAAATTATGTATACCTGCTGAACACAAAAG CAACCATAGAGAACGGTGCTGATGTGACAACTCAAAGTGGTATGTTCTCCACGAGCGATAT CAGCATCTCTGGTAATCTGTCCATGACAGGCAATCCCGACAAAGACAATAAATTCCGAGCCC TCAATATATCTGAATGATGCTTCTTATCTACTGACTGACGACTCCGCCAGACTCGTTGCCAA AAATAAAGCATCTGTGGTGGGAGATATACTACTCCACTAAAAGTGCATCCATCATGTTTGGT CATGATGAAAGCGACCTCTCGCAGTTGTCTGACAGAACCTCAAAGGGCTTGCACCTGGTC TTTTAGGTGGCTTTGATGTCTCATATCGCGTTTCAGTCAATGCCCCGTGACATCTGCCACT ATGAACAAYACCTGGTGGCAACTAACCGGAGATTCTGCGCTGAAAACACTGAAAAGTACAA ACAGCATGGTCTATTTCACTGACAGCGCAAACAATAAGAAATTCATACGCTGACGGTCTGA TGAGCTGGCAACCAGCAACAGCGCCTATGCGATGCGTACAAACCTTCTGAATCAGACAAA CTGGAGGTCAAAAACACYGTCTGGTGGAGAACAATTTTTACTCGTTGATTTCTTCAGAA ACCAACGCCTGAAAAACAACACTGAATATTGAACTGGTAAGCGCGCCAAAAGACACCAATGA AAATGTCTTTAAAGCCAGTAAACAACCATTTGGTTTCAGTGATGTAACGCCGGTCAATTACAA CCAGGGAAACCGATGACAAAATAACATGGTCACTGACAGGCTATAACACGGTAGCAAACA AGGAAGCAACCCGGAATGCCGCCGCCCTGTTCTCTGTTGACTATAAAGCGTTTTCTGAACGA GGTCAACAACCTGAACAAACGTATGGGTGACCTGCGTGATATCAACGGCGAAGCCGGTGC ATGGGCACGCATCATGAGCGGTACCGGCTCTGCCAGTGGTGGTTTCAGTGACAACACTACAG CACGTTCAGGTCGGGGTCGACAAAAACAGGACTGGACGGACTGGATTTGTTTACCGGT TCACTGTCACACACACTGACAGCAGTGCCTCCGCCGATGTTTTTCAGTGGTAAAACGAAGTC TGTGGGGGCTGGCCTGTATGCTTCCGCCATGTTTGATTCCGGTGCCTATATCGACCTGATTG GCAAGTATGTTACCATGATAATGAGTACACTGCAACCTTGGCCGACTCGGAACCCGTGA TTACAGCACGCATTCATGGTATGCCGGTGCAGAAGCGGGCTACCGCTATCATGTCACTGAG GATGCCTGGATTGAGCCACAGGCTGAGCTGGTTTACGGTCTGTATCCGGTAAACAGTTTG CATGGAAGGACCAGGGAATGCATCTGTCCATGAAGGACAAGGACTACAATCCGCTGATTG GCCGAACGGGTGTGGATGTGGGTAAATCCTTCTCTGGTAAGGACTGGAAAGTGACAGCCC GTGCCGGTCTGGGCTACCAGTTCGACCTGCTGGCTAACGGCGAAACCGTATTGCGGGATG CATCTGGTGAAAAACGCATCAAAGGTGAAAAGGACAGCCGATGCTGATGTCCGTTGGCC TGAATGCAGAAATCAGGGATAACGTCCGCTTTGGACTGGAGTTTGAGAAATCCGCCTTTGG TAAGTACAACGTTGATAATGCWGTCAACGCTAATTTCCGTTACTCGTTCTGA </p> |
| flu | <p> ATGAAACGACATCTGAATACCTGCTACAGGCTGGTATGGAATCACATTACGGGCGCTTTTCG TGGTTGCCCTCCGAACTGGCCCGCGCACGGGGTAAACGTGGCGGTGTGGCGTTGCACTGT CTCTTGCCGAGTCACGTCACTCCCGGTGCTGGCTGCTGACATCGTTGTGCACCCGGGAGA AACCGTGAACGGCGGAACACTGGCAAATCATGACAACAGATTGTCTTCGGTACGGCCAA CGGAATGACCATCAGTACCGGGCTGGAGTATGGGCCGATAACGAGGCCAATACCGGCG GDCAATGGATACAVVATGGCGGHACHGCCAACAACACBACTGTCACCGGTGGTGGTCTTC AGAGAGTGAABGCCGGTGAAGTGTCTCAGACACGGTTATCAGTGCCGGAGGCGGACAG AGCCTTCAGGGGCAGGCTGTGAACACCACBCTGAACGGTGGTGAACAGTGGATACATGAA </p> |

GGCGGGATTGCAACVGAACCGTCATTAATGAGAAGGGCTGGCAGGCCATCAAACCCGGC
GCAGTGGCAACCGAHACCGTTGTBAATACCGGBGCGGAAGGGGGACCGGATGCDGAAAA
TGGTGATACCGGGCAGATBGTCBGCGGGGATGCCGTACGCACCACCATCAATAAAAATGG
TCGBCAGATTGTGDGDGCTGAAGGAACGGCAAATACCACTGTGGTTTATGCCGGCGGCGA
CCAGACTGTACATGGTCACGCACTGGATACCACGCTGAATGGGGGATACCAGTATGTGCAC
AACGGCGGTACDGCCTGACACTGTTGTDAACAGTGACGGCTGGCAGATTGTCAAAAAC
GGGGGTGTGGCCGGGAATACCACCGTTAATCAGAAGGGCAGACTGCAGGTGGACGCCGG
TGGTACAGCCACGAATGTCACCCTGAAGCAGGGCGGCGCACTGGTTACCAGTACGGCTGC
AACCGTTACCGGCATAAACCGCCTGGGAGCATTCTCTGTTGTGGAGGGTAAAGCTGATAAT
GTCGTAAGTGGAAAATGGCGGACGCTGGATGTGCTGACCGGACACACAGCCACTAATACC
CGCGTGGATGATGGCGGAACGCTGGATGTCCGCAACGGTGGCACCGCCACCACCGTATCC
ATGGGAAATGGCGGTGACTGCTGGCCGATTCCGGTGCCGCTGTCAGTGGTACCCGGAGC
GACGGAAGGCATTGATATCGGAGGCGGTCAGGCGGATGCCCTGATGCTGGAAAAAGG
CAGTTCATTACGCTGAACGCCGGTGATACGGCCACGGATACCACGGTAAATGGCGGACT
GTTACCGCCAGGGGCGGCACACTGGCGGGCACCACCACGCTGAATAACGGCGCCATACT
TACCCTTCCGGGAAGACGGTGAACAACGATAACCCTGACCATCCGTGAAGGCGATGCACTC
CTGCAGGGAGGCTCTCTACCGGTAACGGCAGCGTGGAAAAATCAGGAAGTGGCACACTC
ACTGTCAGCAACACCACACTCACCCAGAAAGCCGTCAACCTGAATGAAGGCACGCTGACGC
TGAACGACAGTACCGTACCCACGGATGTCATTGCTCAGCGCGGTACAGCCCTGAAGCTGAC
CGGCAGCACTGTGCTGAACGGTGCCATTGACCCACGAATGTCACTCTCGCCTCTGGTGCC
ACCTGGAATATTCCCGATAACGCCACGGTGCAGTCCGGTGGTGGATGACCTCAGCCATGCCG
GACAGATTCAATTCACCTCCACCCGCACAGGGAAGTTCGTACCGGCAACCCTGAAAGTGAA
AAACCTGAACGGACAGAATGGCACCATCAGCCTGCGTGTACGCCCGGATATGGCACAGAA
CAATGCTGACAGACTGGTCAATGACGGTGGCAGGGCAACCGGAAAAACCATCCTGAACCT
GGTGAACGCCGGCAACAGTGCCTCGGGGCTGGCGACCAGCGGTAAGGGTATTGAGGTGG
TGGAAGCCATTAACGGTGCCACCACGGAGGAAGGGGCTTTATCCAGGGGAATAAGCTGC
AGGCCGGTGCCTTAACTACTCCCTCAACCGGGACAGTATGAGAGCTGGTATCTGCGCAG
TGAAAAATGCTTATCGTGCAGAAGTCCCCCTGTATGCCTCCATGCTGACACAGGCAATGGAC
TATGACCGGATTCTGGCAGGCTCCCGCAGCCATCAGACCGGTGTAACGGTGAATAAAC
AGCGTCCGTCTCAGCATTGAGGGCGGTGATCTCGGTACGATAACAACGGCGGTATTGCC
GTGGGGCCACGCCGAAAGCAGCGGCAGCTATGGCTTCGTCCGTCTGGAGGGTACCTGC
TGAGAACAGAGGTTGCCGGTATGTCTCTGACGACAGGGGTGATGGTGTGCTGACGGCCATT
CTTCCGTTGATGTTAAGGATGATGACGGCTCCCGCGCCGGCACGGTCCGGGATGATGCCG
GCAGCCTGGGCGGATACCTGAATCTGACACACAGTCCCTCCGGCCTGTGGGCTGACATTGT
GGCACAGGGAACCCGCCACAGCATGAAAGCGTCATCGGACAATAACGACTTCCGCGCCCG
GGGCTGGGGCTGGCTGGGCTCACTGGAACCGGTCTGCCCTTCACTGATCACTGACAACCTG
ATGCTGGAGCCACAACACTGCAGTATACCTGGCAGGGACTTCCCTGGATGACGGTAAGGAC
AACGCCGGTTATGTGAAGTTCGGGCATGGCAGTGCACAACATGTGCGTGCCGGTTTCCGTC
TGGGCAGCCACAACGATATGACCTTTGGTGAAGGCACCTCATCCCGTGCCCCCTGCGTGA
CAGTGCAAAACACAGTGTGCGTGAACCTGCCGGTGAACCTGGTGGGTACAGCCTTCTGTTATC
CGCACCTTCACTCCCGGGGTGATATGCGTGTGGGGACHTCCACHGCAGGCAGCGGGATG
ACGTTCTCACCTCACAGAATGGCACDTCAGTGGACCTGCAGGCCGGACTGGAAGCCCGTG

| |
|--|
| TCCGGGAAAATATCACCTGGGCGTTCAGGCCGTTATGCCACAGCGTCAGCGGCAGCA GCGCTGAAGGTTATAACGGTCAGGCCACGCTGAATGTGACCTTCTGA |
|--|

Anexo 11. *Número de acceso de los genes fimbriales y autotransportadores utilizados en el estudio.*

| Gen | Descripción | Número de acceso |
|-------------|--|-------------------------|
| <i>crl</i> | <i>Escherichia coli</i> O104: H4 str. 2011C-3493 | 13703294 |
| <i>csgA</i> | <i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 2011C-3493 chromosome, complete genome | 13701123 |
| <i>csgD</i> | <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655, complete genome | 949119 |
| <i>fimH</i> | <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655, complete genome | 948847 |
| <i>cah</i> | <i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933 genome | 958808 |
| <i>ehaA</i> | <i>Escherichia coli</i> O157: H7 str. EDL933 genome | 4714099 |
| <i>ehaB</i> | <i>Escherichia coli</i> O157: H7 str. EDL933 genome | 957315 |
| <i>espP</i> | <i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai plasmid pO157, complete sequence | 1789732 |
| <i>flu</i> | <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655, complete genome | 946540 |