



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)

**Diversidad genética y distribución de ecotipos de *Escherichia coli*
productoras de toxina Shiga (STEC)**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

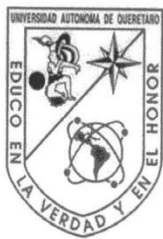
Presenta:

I.I.A. Ricardo Ernesto Ahumada Cota

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero, 2015
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Diversidad genética y distribución de ecotipos de *Escherichia coli*
productoras de toxina Shiga (STEC)**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.I.A. Ricardo Ernesto Ahumada Cota

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Presidente


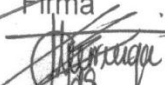

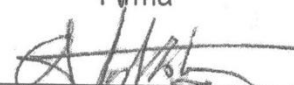
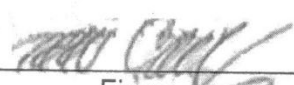
Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretario


Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Vocal

Dr. Carlos Alberto Eslava Campos
Suplente

Dr. Todd R. Callaway
Suplente


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química


Firma

Firma

Firma

Firma

Firma


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2015.
México

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Molecular en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo la dirección del Dr. Gerardo Manuel Nava Morales.

RESUMEN

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es un microorganismo patógeno capaz de generar desde una diarrea leve hasta daño renal agudo. Mundialmente, las STEC causan alrededor de 2,800,000 infecciones anuales en humanos. Se considera que el reservorio natural de STEC es el ganado bovino, aunque también se ha reportado en cerdos y aves. Convencionalmente, los estudios de prevalencia de STEC en granjas y materias primas se realizan a través de aislamientos bacterianos seguidos por la identificación de los genes que codifican para la toxina Shiga (*stx1* y *stx2*). Sin embargo, esta metodología es costosa por la cantidad de reactivos y mano de obra requerida. Por tal motivo, se necesita el desarrollo e implementación de tecnologías alternas para la identificación rápida y precisa de este patógeno. El objetivo del presente trabajo fue diseñar y estandarizar una técnica cultivo-independiente basada en la amplificación de los genes *stx1* y *stx2*. Para este fin, se realizó un análisis bioinformático para seleccionar los iniciadores de PCR capaces de amplificar la mayor diversidad de *stx1* y *stx2*. Posteriormente, se validaron protocolos de PCR para la amplificación de estos dos genes y se comparó el desempeño de dos enzimas Taq-DNA polimerasa comerciales (Thermo Scientific y TaKaRa) en DNA extraído a partir de materia orgánica rica (heces) en sustancias que inhiben la PCR. La DNA polimerasa TaKaRa mostró mejores límites de detección y fue capaz de amplificar muestras inoculadas con 8×10^2 UFC STEC/g. Los protocolos con la enzima TaKaRa Taq-DNA polimerasa se utilizaron para detectar la presencia de *stx1* y *stx2* en 85 muestras ambientales provenientes de diferentes unidades de producción animal (ganado lechero, ganado de engorda y cerdos). Los análisis moleculares revelaron que 7.05% (6/85 muestras) fueron positivas a *stx1*, 52.94% (45/85) para *stx2* y 21.17% (18/85) para ambos genes. Estos resultados confirman la presencia de STEC en unidades de producción animal y resalta la importancia de los métodos moleculares para identificar la presencia de este patógeno. Esta herramienta microbiológica será de gran utilidad para conocer la diversidad de STEC en México e implementar medidas sanitarias de control.

Palabras clave: STEC, estudio de prevalencia, PCR, gen *stx*

SUMMARY

Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) is an important foodborne human pathogen. Globally, it causes ~2,800,000 infections annually. It has been proposed that cattle are the main reservoir for STEC; nevertheless, this pathogen has been recovered from other animal species (e.g. swine and poultry). Conventionally, STEC surveys in farms and food are conducted using traditional microbiological methods. Unfortunately, these methods are time consuming and require specialized facilities. For these reason, it is important to design rapid and inexpensive molecular surveillance tools to study the prevalence and distribution of STEC in farm animals. In the present study, we design a robust and rapid method for the detection of *stx1* and *stx2* genes from environmental samples without the need of pre-enrichment or enrichment steps. To achieve this goal, we performed a bioinformatic analysis to select a set of PCR primers capable of detecting the *stx* genes diversity. Later, we standardized PCR protocols for the identification of *stx1* and *stx2* genes and tested the performance of two commercially available Taq-DNA enzymes (Thermo Scientific and TaKaRa) for the amplification of DNA extracted from feces. TaKaRa Taq-DNA polymerase had a better detection limit, amplified the *stx* genes from feces inoculated with 8×10^2 CFU STEC/g. The TaKaRa Taq-DNA polymerase protocols were used to detect the presence of *stx* genes in 85 environmental samples collected from dairy, cattle and pig farms. The molecular analysis revealed a prevalence of 7.05% (6/85 samples), 52.94% (45/85) and 21.17% (18/85) for *stx1*, *stx2* and both genes, respectively. The results confirmed the presence of STEC in livestock units and highlight the importance of molecular methods for the detection of this pathogen. The molecular tool designed in this study will be of enormous value for the determination of the STEC diversity in Mexico and the application of sanitary strategies.

Keywords: STEC, prevalence assay, PCR, *stx* diversity

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, responsable de la mejor parte de mí. Te amo, mamá.

A mi hermano, que es lo más cercano que tengo y al que querré siempre.

A mis padre que tanto me ha dado y enseñado.

A mi familia y amigos a los que siempre llevo conmigo.

A CONACYT por haberme apoyado durante mis años de becario.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC).....	2
II.2 Hábitats de STEC.....	3
II.3 Toxina Shiga (Stx).....	3
II.3.1 Estructura y clasificación de la toxina Shiga.....	3
II.3.2 Mecanismo de patogenicidad de la toxina Shiga (Stx).....	6
II.4. Relevancia biológica del gen de la toxina Shiga (<i>stx</i>).....	7
II.4.1 Metodología utilizada en la detección de STEC.....	9
III. HIPÓTESIS	10
IV. OBJETIVOS	10
IV.1 OBJETIVO GENERAL	10
IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
V. MATERIALES Y MÉTODOS	11
V.1 Materiales.....	11
V.1.1 Medios de cultivo.....	11
V.1.2 Soluciones.....	11
V.1.3 Reactivos.....	11
V.1.4 Material biológico.....	11
V.2 Métodos.....	12
V.2.1 Elaboración de una base de datos bioinformática de la diversidad del gen <i>stx</i>	12
V.2.2 Especificidad de los iniciadores de PCR para la detección del gen <i>stx</i>	12
V.2.3 Muestreo piloto de colecta de materia orgánica con el sistema de hisopos de arrastre.....	14
V.2.4 Extracción del material genético.....	14
V.2.5 Estandarización de ensayos moleculares para la detección de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> en muestras ambientales.	15
V.2.5.1 Selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> en heces.....	15
V.2.5.2 Límite de detección de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> en heces.	16
V.2.6 Prevalencia de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> en granjas de vacas lecheras, becerros de engorda y cerdos.	16
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
VI.1 Elaboración de una base de datos bioinformática de la diversidad del gen <i>stx</i>	18
VI.2 Especificidad de los iniciadores de PCR para la detección del gen <i>stx</i>	23

VI.3 Muestreo piloto de colecta de materia orgánica con el sistema de hisopos de arrastre.	24
VI.4 Selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> en heces.....	25
VI.5 Límite de detección de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> en heces.	26
VI.6 Prevalencia de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> en hatos de explotación pecuaria.....	28
VII. CONCLUSIONES	32
VIII. BIBLIOGRAFÍA	33

1

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1.	Homología en secuencia de aminoácidos entre subtipos de Stx1.	6
2.	Homología en secuencia de aminoácidos entre subtipos de Stx2.	6
3.	Características relevantes de subtipos de Stx.	7
4.	Pares de iniciadores para la amplificación del gen <i>stx</i> seleccionados de la literatura.	13
5.	Tipo de granjas y número de muestras colectadas.	17
6.	Números de acceso en GenBank que conforman la base de datos creada de la diversidad de <i>stx</i> .	19
7.	Matriz del nivel de similitud (%) entre los diferentes subtipos de <i>stx</i> .	20
8.	Porcentaje de efectividad de los pares de iniciadores reportados para la detección de <i>stx in silico</i> .	23
9.	Prevalencia de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> para los diferentes tipos de granjas muestreados.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Estructura general de la familia Stx.	5
2.	Homología de las secuencias de <i>stx</i> .	21
3.	Árbol filogenético de las secuencias de <i>stx</i> .	22
4.	Cantidad de materia orgánica recuperada de los hisopos de arrastre.	24
5.	Selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> .	26
6.	Gradiente de temperatura ($57 \Delta 20^{\circ}\text{C}$) para la optimización de la PCR.	27
7.	Estandarización del límite de sensibilidad de la PCR para detectar <i>stx1</i> y <i>stx2</i> a diferentes concentraciones.	28

I.INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud reconoce a las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés) como patógenos relevantes para el hombre, debido a que causan severos brotes infecciosos asociados al consumo de alimenticios. Recientemente, se estimó que a nivel mundial las STEC causan ~2,800,000 infecciones anuales.

El principal factor de virulencia de STEC es la citotoxina Shiga (Stx), la cual se clasifica en Stx1 y Stx2 por la variación en su secuencia de aminoácidos. Las STEC más estudiadas son las que pertenecen al serovar O157:H7; sin embargo, existen más de 100 serovares asociados a la producción de esta toxina. Además, existen reportes de cepas de *E. coli* O157:H7 que no producen esta toxina. Se presume que el reservorio natural de STEC es el ganado bovino, específicamente la STEC O157:H7. Sin embargo, se ha reportado que otras especies de animales destinados al consumo humano, también son portadores de este grupo de patógenos.

Recientemente se ha reconocido la importancia de serovares de STEC diferentes a O157:H7. Por tal motivo se requieren nuevas metodologías microbiológicas para identificar la diversidad de este patógeno. Las nuevas herramientas deben ser rápidas, económicas, cultivo-independiente, fácilmente adaptables y capaces de identificar la presencia de los genes *stx1* y *stx2* en muestras ambientales.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar un ensayo molecular basado en la amplificación de los genes *stx1* y *stx2* capaz de identificar de forma oportuna la presencia de STEC en unidades de producción animal. Esta herramienta será importante para conocer la prevalencia y diversidad genética de este patógeno y establecer medidas sanitarias para su control.

II. ANTECEDENTES

II.1 *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC).

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés) causa anualmente 2,801,000 infecciones humanas alrededor del mundo (Majowicz *et al.*, 2014). Se reconoce que existen más de 100 serovares de *E. coli* asociados a infecciones humanas (C L Gyles, 2007). Las STEC se diferencian de otros patotipos de *E. coli* por su capacidad de producir toxina Shiga (Stx), tener una dosis mínima infectiva relativamente baja de entre 10-100 células (Willshaw *et al.*, 1994)(Tilden *et al.*, 1996) y generar un cuadro de síntomas que van desde una diarrea leve a severa hasta síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés); caracterizado por generar trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática y falla renal aguda (Mele *et al.*, 2014). El Centro de control de enfermedades en EE.UU. (CDC, por sus siglas en inglés), engloba a STEC entre los primeros cinco patógenos relacionados al consumo doméstico de alimentos que provocan hospitalización (CDC, 2011).

El CDC reportó que en el 2012 se presentaron un total de 4,756 casos infecciosos por STEC asociados al consumo de alimentos contaminados (CDC, 2015). En Europa, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) reportó para el 2013, 5,301 infecciones causadas por STEC (Eurosurveillance, 2013). Desafortunadamente, a pesar de que existen reportes de STEC en Asia (Mekata *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2015) y en países latinoamericanos (Fernández *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2008), no se cuenta con reportes sobre el número de casos infecciosos que se presentan por STEC.

II.2 Hábitats de STEC

Se ha postulado que el hábitat principal de STEC es el tracto gastrointestinal del ganado bovino (lechero y de engorda) (Chase-Topping *et al.*, 2008; Etcheverría & Padola, 2013). Sin embargo, algunos estudios han reportado la presencia de STEC en el tracto gastrointestinal de otros animales destinados al consumo humano. Por esa razón, los estudios de prevalencia de STEC se enfocan en el análisis microbiológico del contenido intestinal y heces de animales destinados al consumo humano.

En ganado lechero, un estudio desarrollado en Brasil, reportó una prevalencia de STEC del 72.72% en 198 muestras de hisopados rectales de animales en producción. De los aislamientos recuperados, el gen *stx1* tuvo una prevalencia de 70.88% (202/285 aislamientos), *stx1/stx2* se encontraron en el 18.95% (54/285) y *stx2* en el 10.88% (29/185) (Ferreira *et al.*, 2014). En Argentina, un estudio realizado en granjas lecheras mostró una prevalencia de STEC de 37.5% (540/1440 vacas). En los aislamientos obtenidos, el gen *stx2* fue el más prevalente, 52% (89/170 aislamientos), seguido por *stx1* y *stx2* con el 37% (62/170) y el gen *stx1* con 11% (19/170) (Fernández *et al.*, 2010). En Alemania, análisis de muestras provenientes de vacas lecheras reveló una prevalencia de STEC del 87.14%. De los aislamientos de STEC, el gen *stx2* fue el más prevalente con el 56.65% (626/1105), seguido por *stx1/stx2* con 34.93% (386/1105) y *stx1* solamente en un 8.41% (93/1105) de los aislados (Menrath *et al.*, 2010).

En ganado de engorda, un estudio realizado en Japón reportó la presencia de STEC en el 64.2% de las muestras (176/274). En los aislamientos la prevalencia de los genes *stx1/stx2* en el 45.45% (80/176), el gen *stx2* en el 30.68% (54/176) y al gen *stx1* en el 23.86% (42/176) (Mekata *et al.*, 2014). En Minnesota EE.UU. un estudio realizado en granjas reportó la presencia de STEC en el 3.21% de las muestras (71/2208 muestras de excretas); sin embargo no se caracterizó la diversidad de los genes *stx* (Cho *et al.*, 2009)

En cerdos, un estudio realizado en rastros en EE.UU. reportó la presencia de STEC O157:H7 en el 1.96% (6/305) en los animales posterior al sacrificio. De las muestras positivas, el 33.33% (2/6) de las STEC presentaron el gen *stx1*, mientras que el restante 66.67% (4/6) contenían los genes *stx1/stx2* (Feder *et al.*, 2003). En este mismo país, un estudio en granjas de cerdos, reportó una prevalencia de STEC del 65.33% (98/150 cerdos), donde *stx2* estuvo presente en el 98.59% (281/285) de los aislamientos y el gen *stx1* en solamente el 1.4% (Tseng *et al.*, 2015).

En aves de corral, un estudio en granjas de Italia demostró la presencia de STEC O157:H7 en el 3.6% (26/720) de las gallinas muestreadas; sin embargo no se caracterizó la diversidad de los genes *stx* (Dipineto *et al.*, 2006). En la India, se obtuvieron aislamientos de pollos de engorda, donde STEC mostró una prevalencia del 20.4% (10/49 animales). De estos aislamientos, se identificó la presencia del gen *stx1/stx2* en el 40% (4/10 aislamientos), de *stx1* en otro 40% (4/10) y al gen *stx2* en el 20% (2/10) (Dutta *et al.*, 2011).

Estos estudios demuestran que los animales destinados al consumo humano pueden ser portadores de *E. coli* que contengan los genes *stx* (*stx1* y/o *stx2*), lo que los convierte en un reservorio importante de este patógeno. Por tal motivo es necesario desarrollar e implementar metodologías microbiológicas que permitan identificar STEC, de manera rápida y precisa, en productos agroalimentarios y muestras ambientales.

II.3 Toxina Shiga (Stx)

II.3.1 Estructura y clasificación de la toxina Shiga

Las toxinas que pertenecen a la familia Stx comparten la misma estructura general, una subunidad A (dividida en A1 y A2) y un pentámero proteico denominado subunidad B, (**Figura 1**). Basado en la homología de secuencia de

aminoácidos, esta toxina se clasifica en dos grandes grupos: Stx1, homologa a la toxina de *Shigella dysenteriae*; y Stx2.

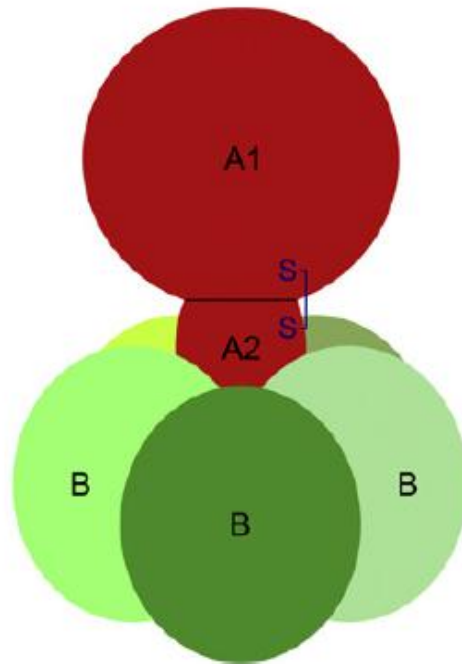


Figura 1. Estructura general de la familia Stx. La estructura se divide en: i) la subunidad A dividida en A1 y A2 (color rojo) unidos por un enlace disulfuro (color azul) y responsable de la capacidad citotóxica de la toxina; y ii) la subunidad B, un pentámero de unidades idénticas (color verde) que conforman un anillo responsable de la adherencia a receptores celulares de membrana (**adaptado de Bergan *et al.*, 2012**).

Entre los grupos Stx1 y Stx2 hay una similitud de secuencia de aminoácidos de ~50%. El porcentaje de identidad a nivel de aminoácido permite clasificar cada grupo en subtipos. Stx1 se divide en tres subtipos (Stx1a, Stx1c y Stx1d) y Stx2 en siete (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g) (Bergan *et al.*, 2012; Scheutz *et al.*, 2012). Los subtipos de Stx1 son altamente homólogos, comparten entre 92 y 100% de identidad a nivel de aminoácidos (**Cuadro 1**). En contraste, los subtipos de Stx2 sólo comparten del 70 al 95% de su secuencia de aminoácidos (**Cuadro 1 y 2**) (Bergan *et al.*, 2012). Debido a las diferencias de homología entre los subtipos de Stx, los genes que codifican para esta proteína

son fácilmente detectables mediante ensayos moleculares y se podría diseñar una técnica molecular que sea capaz de detectar una Stx específica.

Cuadro 1. Homología en secuencia de aminoácidos entre subtipos de Stx1. Los subtipos de Stx1y Stx2a se comparan contra Stx1 (prototipo del grupo) y los resultados se expresan como porcentaje de homología (**Bergan et al., 2012**).

Secuencia referencia	Subunidad de la toxina	Toxina Stx2a	Subtipos		
			Stx1a	Stx1c	Stx1d
Stx1	A	55%	99%	97%	94%
	B	57%	100%	97%	92%

Cuadro 2. Homología en secuencia de aminoácidos entre subtipos de Stx2. Los subtipos de Stx2 se comparan contra Stx2a (prototipo del grupo) y los resultados se expresan en porcentaje de homología (**Bergan et al., 2012**).

Secuencia referencia	Subunidad de la toxina	Stx2b	Stx2c	Subtipos			
				Stx2d	Stx2e	Stx2f	Stx2g
Stx2a	A	94%	100%	99%	94%	71%	96%
	B	89%	97%	97%	87%	83%	94%

II.3.2 Mecanismo de patogenicidad de la toxina Shiga (Stx)

El mecanismo de patogenicidad de Stx en células humanas se conoce desde aproximadamente dos décadas. Primero, la subunidad B de Stx es reconocida por el glucolípidos celular de membrana Gb₃ que le permite introducirse a la célula blanco (Jacewicz *et al.*, 1986). Posteriormente, Stx viaja a través del citosol donde la maquinaria celular interna separa A1 (parte activamente tóxica) de A2 y de la subunidad B (fragmentos no tóxicos) (**Figura 1**). Finalmente, A1 es transportada hasta los ribosomas en donde se adhiere a la adenina en la posición 4,324 de la subunidad 28S rRNA impidiendo así la síntesis de proteínas (Endo *et al.*, 1988; Johannes & Römer, 2010).

La virulencia de Stx varía entre los miembros de la familia (**Cuadro 3**). Por ejemplo el grupo Stx2 es más prevalente en paciente que desarrollan HUS (Mele *et al.*, 2014). También se ha reportado que el subtipo Stx2e asociado a cerdos con edema, tiene una mayor afinidad a la glucoproteína globotetrasolilceramida (Gb₄) (Weinstein *et al.*, 1988). Un estudio realizado con 5 subtipos de Stx (Stx1a, Stx2a, Stx2b, Stx2c y Stx2d) en ratones y cultivo celular renal, mostró que Stx2a y Stx2d fueron más citotóxicos comparado con los otros subtipos. Este efecto se atribuyó a las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la subunidad B, la responsable de introducir la toxina a la célula (Fuller *et al.*, 2011). Estos datos indican que la diversidad genética de Stx está vinculada a la virulencia de la toxina. Por esta razón es importante caracterizar la diversidad de *stx* prevalente en productos agroalimentarios.

Cuadro 3. Características relevantes de subtipos de Stx.

Subtipo	Características relevantes	Referencias
Stx1	Citotoxina, primera toxina Shiga reportada de ser producida por cepas de <i>E. coli</i> .	(Strockbine <i>et al.</i> , 1986)
Stx1c	Encontrada en pacientes asintomáticos, produce diarrea leve en humanos.	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
Stx2	Relacionada a enfermedades severas en humanos.	(Gyles, 2007)
Stx2c	Asociada a diarrea y HUS; común en STEC aisladas de ganado ovino.	(Schmitt <i>et al.</i> , 1991)
Stx2d	Productora de diarreas leves en humanos; común en STEC que carecen el factor de virulencia <i>eae</i> .	(Piérard <i>et al.</i> , 1998)
Stx2e	Asociada a enfermedad en cerdos; en humanos produce diarreas leves y/o infecciones asintomáticas.	(Sonntag <i>et al.</i> , 2005a)
Stx2f	Identificado por primera vez en pichones, posteriormente se ha encontrado en casos de infección de STEC en humanos.	(Sonntag <i>et al.</i> , 2005b)

II.4 Relevancia biológica del gen de la toxina Shiga (*stx*)

El gen *stx* se encuentra en el genoma de un diverso grupo de bacteriófagos o fagos (virus bacterianos) llamados fagos-*stx*, cada tipo de Stx

proviene de un fago específico. Estos virus insertan, vía transducción, su material genético en el genoma de *E. coli*, confiriéndoles la habilidad de producir la Stx. En la mayoría de los fagos-*stx*, el gen *stx* se localiza río abajo del gen anti-terminador Q y río arriba del conjunto de genes responsables de la lisis bacteriana (Allison, 2007).

Se presume que la producción de la Stx confiere una ventaja biológica frente al ataque de protozoarios que habitan el tracto gastrointestinal de bovinos, portadores asintomáticos de STEC (Los *et al.*, 2013). Esto fue evidenciado en un estudio *in vitro* realizado por Steinberg y Levin, en donde incubaron a *Tetrahymena pyriformis*, un protozoario que se alimenta de bacterias, con una cepa de *E. coli* portadora y otra no portadora del gen *stx*. Su trabajo demostró que la STEC es más resistente a la depredación por *T. pyriformis*, sugiriendo que el gen *stx* es una herramienta evolutiva de supervivencia (Steinberg & Levin, 2007). Esta idea fue confirmada por Lainhart y colaboradores, quienes demostraron que cepas de STEC portadoras de Stx2 co-cultivadas con *T. thermophila* (protozoario depredador de bacterias) reducen la población del protozoario hasta un 50% (Lainhart *et al.*, 2009). Estudios posteriores realizados por Stolfa y Koudelka, corroboraron que STEC tienen la capacidad de eliminar a su depredador y demostraron que la subunidad B de Stx2 es reconocida por receptores de membrana en la superficie de *T. thermophila* (Stolfa & Koudelka, 2013). De forma interesante, la protección contra este depredador no ocurre con STEC portadoras de Stx1 (Lainhart *et al.*, 2009). Los estudios anteriores sugieren que la presencia del gen *stx2* en *E. coli* podría ser un mecanismo de resistencia a la depredación por protozoarios. Por lo tanto, el nicho ecológico podría influir en la diversidad de Stx. Específicamente, rumiantes, cuya microbiota intestinal está integrada por una gran diversidad de protozoarios.

II.4.1 Metodología utilizada en la detección de STEC

El método tradicional para la identificación de STEC se basa en el aislamiento bacteriano usando medios de cultivo selectivos y diferenciales suplementados con sales biliares o antibióticos como Cefixima para inhibir bacterias Gram positivas y promover el desarrollo de bacterias fermentadoras de lactosa, como *E. coli*. Finalmente, los coliformes aislados son sometidos a una identificación molecular (PCR) de los genes de *stx1* y/o *stx2*.

El aislamiento de bacteriano es considerado el método estándar y se emplea por autoridades sanitarias alrededor del mundo. Por ejemplo, la Food and Drug Administration de EE.UU, recomienda un pre-enriquecimiento de las muestras en agua amortiguadora de peptona (AAP) modificada con piruvato. Una alícuota de este caldo de enriquecimiento es sometido a ensayos de PCR para la identificación de los genes *stx1* y *stx2*. Los caldos positivos, son cultivados en Agar TC-SMAC, Rainbow® O157 y R&F O157:H7. Los aislamientos con características fenotípicas de STEC, son sometidos a pruebas de aglutinación en placa para identificar el serovar y su subsecuente confirmación por PCR para la amplificación de *stx1* y *stx2* (Feng *et al.*, 2015). De manera similar, la EFSA utiliza el método de detección de STEC descrito en la ISO/TS 13136:2012. La muestra es pre-enriquecida en AAP y sometida a ensayos de PCR para la identificación de los genes *stx1* y *stx2*. Finalmente, se realiza un aislamiento en placa usando Agar Nutritivo (Hald, 2013).

Desafortunadamente, el aislamiento de STEC puede demorar más 48 horas. Por esta razón, numerosos investigadores han planteado el uso de metodologías rápidas para la oportuna identificación de este patógeno en muestras ambientales o clínicas. Estos métodos alternos son cultivo-independientes y altamente sensibles (Bélangier *et al.*, 2002; Sekse *et al.*, 2005; Grys *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2013; Tunsjø *et al.*, 2015).

III. HIPÓTESIS

La diversidad genética de *stx1* y *stx2* permitirá desarrollar ensayos cultivo-independiente para la detección directa y rápida de STEC a partir de muestras ambientales.

IV. OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar, estandarizar e implementar un método de PCR altamente sensible que logre detectar de manera directa (cultivo-independiente) la presencia de *stx1* y *stx2* en muestras ambientales provenientes de unidades de producción de ganado bovino lechero, de engorda y cerdos.

IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar mediante tecnologías bioinformáticas, iniciadores de PCR específicos que ayuden a detectar toda la diversidad del gen *stx*.
2. Estandarizar e implementar un ensayo de PCR altamente sensible que detecte la presencia del gen *stx* en heces provenientes de granjas de bovinos y cerdos.
3. Determinar la prevalencia y diversidad del gen *stx* en granjas de ganado bovino y porcino.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Materiales

- Fotodocumentador (MiniBis Pro)
- Mini-sistema de electroforesis horizontal (Bio-rad)
- Materiales de uso común en un laboratorio de alimentos
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio)
- PowerLyzer® 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer (MoBio)
- Termociclador, modelo c1000 de 96 pozos (Bio-rad)

V.1.1 Medios de cultivo

- Agar soya triptica (AST), (BD Bioxon)
- Caldo soya triptica (CST), (BD Bioxon)

V.1.2 Soluciones

- Agarosa al 1, 1.5 y 2% (Invitrogen)
- Diluyente de peptona 0.1% (DP) (Peptona de caseína, BD Bioxon)
- Solución salina isotónica (SSI) 0.85%
- Solución amortiguadora de fosfatos 1X

V.1.3 Reactivos

- Enzimas comerciales para realizar la PCR:
 - TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version
 - Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase

V.1.4 Material biológico

- *Escherichia coli* O157:H7 cepa EDL 933 (portadora de los genes *stx1* y *stx2*) donada por el Dr. Carlos Alberto Eslava Campos de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

V.2 Métodos

V.2.1 Elaboración de una base de datos bioinformática de la diversidad del gen *stx*.

Se creó una base de datos con secuencias de nucleótidos que incluyera todos los genotipos de *stx* reportados en la literatura. Esta base de datos se elaboró con la finalidad de validar la eficiencia de los iniciadores para reconocer su secuencia blanco. Para integrar la base de datos, se realizó una búsqueda en la literatura científica de las secuencias de referencia de cada tipo de *stx*. Los números de acceso fueron registrados y las secuencias descargadas del GenBank. Posteriormente, cada secuencia se sometió a una búsqueda de secuencias homologas usando la herramienta BLAST del NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Secuencias con un porcentaje de identidad $\geq 99\%$ y $\geq 95\%$ de cobertura fueron descargadas y depositadas en nuestra base de datos. La base de datos quedó integrada por 28 secuencias de *stx1* y 98 secuencias de *stx2*.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se alinearon utilizando el programa bioinformático MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) y se calculó el porcentaje de identidad para cada subtipo de *stx*. Los alineamientos de secuencias fueron utilizados para la construcción de un árbol filogenético utilizando el método de Maximum-Likelihood (Kishino & Hasegawa, 1989) para confirmar los diferentes linajes de las secuencias de *stx*.

V.2.2 Especificidad de los iniciadores de PCR para la detección del gen *stx*.

A través de una búsqueda en la literatura científica se seleccionaron 14 pares de iniciadores (**Cuadro 4**) reportados frecuentemente para la detección del gen *stx*. De esta búsqueda, se obtuvieron seis iniciadores específicos para *stx1*, nueve para *stx2* y uno para la detección de ambos. Para determinar la efectividad de estos pares de iniciadores para reconocer su secuencia blanco, se realizó un análisis de PCR *in silico*, utilizando el programa Primer-Blast del NCBI (Ye *et al.*, 2012). La eficiencia de cada par de iniciadores se estimó usando el número de ciertos (secuencias detectadas) entre el total de secuencias blanco.

Cuadro 4. Pares de iniciadores para la amplificación del gen *stx* seleccionados de la literatura.

<i>stx1</i>			<i>stx2</i>		
Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Referencia ^A	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Referencia ^A
Scheutz 1-F	ATGTCATTGCTCTGCAATAGGTAC	PMC3421821	Scheutz 2A-F	GGCACTGTCTGAACTGCTCCTGT	PMC3421821
Scheutz 1-F	GAAGAAGAGACTGAAGATTCATCTG	PMC3421821	Scheutz 2A-R	ATTAAGTGCCTTCAGCAAATCC	PMC3421821
Lee 1A-F	TCAACGAAAAATAACTTCGCTGAATCCC	PMC2211750	*Scheutz 2B-F	GGCACTGTCTGAACTGCTCCTGT	PMC3421821
Lee 1A-R	CAGTTAATGTGGTTGCGAAGGAATTTACC	PMC2211750	*Scheutz 2B-R	TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC	PMC3421821
Lee 1B-F	TGTAACCGCTGTTGTACCTGG	PMC2211750	‡Scheutz 2C-F	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT	PMC3421821
Lee 1B-R	TTAATACTGAATTGTCATCATCATGC	PMC2211750	‡Scheutz 2C-R	TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC	PMC3421821
Lin-F	GAACGAAATAATTTATATGT	8231968	Lee 2A-F	ATGAAGTGTATATTATTTAAATGGGACTGTG	PMC2211750
Lin-R	TTTGATTGTTACAGTCAT	8231968	Lee 2A-R	TCAGTCATTATTAAGTGCCTTCAG	PMC2211750
Pass 1-F	ACGTTACAGCGTGTTCRGGGATC	PMC86652	Lee 2B-F	TTGCATTAGCTTCTGTTAATGCA	PMC2211750
Pass 1-R	TTGCCACAGACTGCGTCAGTRAGG	PMC86652	Lee 2B-R	CATTCCGGAACGTTCCAG	PMC2211750
Cebula 1-F	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	PMC227922	Lin-F	GAACGAAATAATTTATATGT	8231968
Cebula 1-R	CACCAGACAATGTAACCGCTG	PMC227922	Lin-R	TTTGATTGTTACAGTCAT	8231968
			Pass 2A-F	TGTGGCTGGGTTGTTAATACGGC	PMC86652
			Pass 2A-R	TCCGTTGTCATGGAAACCGTTGTC	PMC86652
			*Pass 2B-F	CCAGAATGTCAGATAACTGGCGAC	PMC86652
			*Pass 2B-R	GCTGAGCACTTTGTAACAATGGCTG	PMC86652
			Cebula 2-F	ATCCTATTCCCGGAGTTTACG	PMC227922
			Cebula 2-R	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	PMC227922

^ANúmero de acceso del artículo en PubMed. *Secuencias reconocidas del gen *stx2e* = 92.85%. ‡Secuencias reconocidas del gen *stx2f* = 10

V.2.3 Muestreo piloto de colecta de materia orgánica con el sistema de hisopos de arrastre.

El sistema de hisopo de arrastre (gaza de 10cm²) aumenta la probabilidad de identificar la presencia de STEC. Esto se debe a que los animales infectados con este patógeno lo excretan al azar en el corral (Uesugi *et al.*, 2007). Se realizó un ensayo piloto para verificar que el sistema de hisopo de arrastre colectaba suficiente materia orgánica para el proceso de extracción de DNA. Las muestras ambientales (excretas animales) se colectaron en la granja experimental de vacas lecheras de la Universidad Autónoma de Querétaro (campus Amazcala). Los hisopos (n = 18) fueron arrastrados ~100 m a lo largo de los corrales de producción animal. Una vez colectadas las excretas, los hisopos se colocaron en una bolsa de cierre hermético y se transportaron a 4°C al laboratorio para su posterior almacenamiento a -20°C. En el laboratorio, a cada bolsa con muestra se le agregó 30 mL de solución amortiguadora de fosfatos y se lavaron los hisopos mediante masajeo manual por 1 min. Una vez terminado este proceso, los hisopos fueron exprimidos y retirados de las bolsas. El lavado (materia orgánica disuelta) se vertió en un tubo de 50 mL y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min. Al finalizar la centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el pellet se almacenó a -20°C. Para conocer la cantidad de materia orgánica colectada por el sistema de hisopo de arrastre, el peso de cada pellet se estimó mediante la diferencia entre el peso del tubo vacío y tubo con el pellet.

V.2.4 Extracción del material genético.

Los pellets de materia orgánica colectados a través del sistema de hisopo de arrastre fueron sometidos a extracción de DNA usando el kit comercial PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio), un sistema de extracción altamente eficaz (Gerd Christensen *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2015). Para la extracción de DNA, se siguieron las recomendaciones del fabricante. La homogenización se realizó a 4,000 rpm por 45 segundos en un equipo comercial PowerLyzer® 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer, (MoBio). La concentración

y pureza del DNA fue evaluada con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). El DNA obtenido fue utilizado para ensayos de PCR. La concentración de DNA de cada muestra se estandarizó a 10 ng/uL de DNA.

V.2.5 Estandarización de ensayos moleculares para la detección de los genes *stx1* y *stx2* en muestras ambientales.

V.2.5.1 Selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes *stx1* y *stx2* en heces.

Con el fin de seleccionar la mejor taq DNA polimerasa capaz de amplificar genes en muestras ricas en sustancias inhibitorias, se utilizaron dos enzimas comerciales: *TaKaRa Ex Taq Hot Start Version* y *Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase*. Para evaluar la eficiencia de la amplificación, alícuotas de 0.25 g de excretas extraídas con los hisopos de arrastre fueron inoculados con 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 y 2×10^4 UFC de STEC EDL 933. Las excretas fueron sometidas a proceso de extracción de ADN usando el kit comercial PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio). La calidad del DNA fue evaluada como se describió anteriormente. Con la finalidad de reducir las sustancias inhibitorias, el DNA obtenido de cada alícuota fue diluido en proporciones 1:10, 1:30 y 1:80. El DNA diluido fue utilizado para ensayos de PCR usando las siguientes condiciones: cada reacción consistió: 0-30 ng/ μ L de DNA, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP, 1 μ M de cada iniciador (Scheutz1 y Cebula2) y 1.25 U Taq polimerasa. Para ambos iniciadores la PCR se realizó con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 s, alineación de 56.2°C por 45 s, una extensión de 72°C por 1 min y extensión final a 75°C por 5 min. La PCR para cada gen se realizaron de forma independiente y los amplicones fueron mezclados antes de su análisis en geles de agarosa a una concentración de 1.5%. Cada pozo del gel fue cargado con 14 uL de producto de PCR. Los geles fueron analizados con un Fotodocumentador (MiniBis Pro).

V.2.5.2 Límite de detección de los genes *stx1* y *stx2* en heces.

Una vez elegida la mejor enzima comercial se prosiguió con la estandarización del límite de detección para los genes *stx1* y *stx2* en STEC usando la cepa EDL 933 como referencia. Primero, se realizaron ensayos de gradiente de temperatura (48.6, 49.6, 51.3, 53.2, 54.5, 56.2, 57.4, 60.2, 61.3, 63.6 y 65.4°C) en el paso de la alineación de los oligonucleótidos con el fin de optimizar la PCR para cada uno de los pares de iniciadores utilizados. Una vez estandarizada la temperatura de alineación, la cepa EDL 933 se inoculó a concentraciones que van de 8×10^7 a 8×10^1 UFC/g de materia. La reacción de PCR y protocolo se llevó a cabo como se describe en la sección **V.2.4.1.** agregando el gradiente de temperaturas en el paso de alineación.

V.2.6 Prevalencia de los genes *stx1* y *stx2* en granjas de vacas lecheras, becerros de engorda y cerdos.

Con el fin de evaluar la potencial aplicación de nuestro método de detección directa de los genes *stx1* y *stx2*, se realizó un estudio en granjas comerciales de vacunos lecheros, becerros de engorda y cerdos. El muestreo se realizó en el periodo agosto-septiembre del 2014. Las granjas visitadas se encontraban en los municipios de Colón, Pedro Escobedo y Ezequiel Montes, del estado de Querétaro de Arteaga. En total, se muestrearon siete diferentes granjas de mediana (500-1000 animales) y pequeña producción (<500 animales). En total se colectaron 85 hisopos de arrastre (40 muestras de vacas lecheras, 12 de becerros de engorda y 33 de cerdos) El número hisopos de arrastre colectados en cada granja, varió dependiendo el número de corrales en la unidad de producción (**Cuadro 5**). Los hisopos fueron arrastrados ~100 m a lo largo de los corrales, procurando pasar por las áreas con mayor tránsito animal y zonas con heces frescas. Los hisopos se depositaron una bolsa estériles de cierre hermético y se transportaron a 4°C al laboratorio para ser almacenadas a -20°C. El procesamiento de los hisopos para la obtención de DNA, se realizó como se

describe a detalle en las secciones **V.2.3** y **V.2.4**. Brevemente, el hisopo fue lavado con 30 mL de solución amortiguadora de fosfatos. Posteriormente el lavado fue centrifugado para formar el pellet de materia orgánica, el cual fue sometido a extracción de DNA usando el kit comercial PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio).

El DNA de cada muestra fue utilizado en ensayos de PCR para detectar la presencia de los genes *stx1* y *stx2*, como se describe en la sección **V.2.4.1**. La PCR para cada gen se realizaron de forma independiente y los amplicones fueron mezclados antes de su análisis en geles de agarosa a una concentración de 1.5%. Cada pozo del gel fue cargado con 14 uL de producto de PCR. Los geles fueron analizados con un Fotodocumentador (MiniBis Pro).

Cuadro 5. Tipo de granjas y número de muestras colectadas.

Tipos de granjas muestreadas	Granjas muestreadas	Número de muestras
Cerdos	2	33
Vacas lecheras	3	40
Becerras de engorda	2	12
Total	7	85

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Elaboración de una base de datos bioinformática que contenga la diversidad de los genes de *stx*.

Se seleccionaron 126 secuencias representativas de la diversidad conocida del gen *stx*, 28 secuencias para *stx1* y 98 para *stx2* (**Cuadro 6**). Los subtipos de *stx1* mostraron un nivel de homología del 96% entre ellos, mientras que los subtipos de *stx2* son 93.3% homólogos (**Cuadro 7**). De manera notable, las secuencias de *stx2f* mostraron un nivel de similitud de ~70% comparadas contra el resto de los subtipos de *stx2*. El análisis de similitud de *stx1* vs *stx2* reveló que existe una homología del 60.7% entre ambos grupos, indicando que provienen de diferente linaje evolutivo (**Figura 2**). Esto fue corroborado con la construcción de un árbol filogenético de Maximum-Likelihood en donde se distinguen dos linajes específicos para cada gen (**Figura 3**). Este nivel de divergencia genética permite la fácil identificación molecular de los genes *stx1* y *stx2* en muestras ambientales.

Cuadro 6. Números de acceso en GenBank que conforman la base de datos creada de la diversidad de *stx*.

Número de acceso en GenBank	Subtipos de <i>stx</i>									
	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2a</i>	<i>stx2b</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>stx2g</i>
M19473.1	AB048237	AY170851	X07865.1	L11078.1	M59432.1	AF479828.1	M21534.1	AB472687	AB048227	
M16625.1	AB048234	LM996246	Z37725.1	AF043627.1	AB015057.1	AF479829.2	AJ313016.1	AJ270998	GU228505	
M23980.1	AB048235	AB050959	AF524944.1	AJ313015.1	DQ235774.1	AY095209.1	X81418.1	AJ010730	GQ995452	
AM230663.1	EU273279	AY986982	AJ272135.1	AJ567997.1	L11079.1	X61283.1	X81417.1	M29153	KF932378	
AM230662.1	GQ429160	AY986981	AF461173.1	AB048225.1	AY633473.1	DQ235775.1	X81416.1		AY443060	
Z36900.1	Z36901	AY986980	AY633471.1	AB048223.1	AY443045.1	AF500190.1	X81415.1		AB048236	
L04539.1	LM997172	AB050958	AY633472.1	AJ567995.1	AY633467.1	AF500189.1	U72191.1		GQ919289	
AB083044.1	DQ449666		EF441599.1	AB012101.1	AY633453.1	AF500191.1	AJ249351.2		FM998843	
Z36899.1	LM995659		EF441609.1	AB048226.1	AF291819.1	AY443047.1	AY332411.1		AJ966783	
M19437.1	LM996413		AY443052.1	AB048229.1	EF441604.1	AY443048.1	FM998838.1		AY286000	
AJ132761.1			AY443054.1	AB048238.1	AY443044.1	DQ059012.1	FM998846.1		AJ966782	
			AY443057.1	AB048228.1	AY443043.1	AF329817.1	FM998844.1			
			EF441613.1	AB048224.1	AY443049.1	AF500192.1	FN182286.1			
			Z50754.1	AB012102.1	AB071845.1	FM998855.1	AM904726.1			
			DQ344636.3	EF441616.1	FM998860.1	FM998840.1				
			EF441619.1		FM177471.1	EF441605.1				
			AY633459.1		EU086525.1					
			GQ429162.1							
			FM998856.1							
			FM998851.1							
			EF441618.1							

Cuadro 7. Matriz del nivel de similitud (%) entre los diferentes subtipos de *stx*.

	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2a</i>	<i>stx2b</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>stx2g</i>
<i>stx1a</i>										
<i>stx1c</i>	96.56									
<i>stx1d</i>	91.55	92.47								
<i>stx2a</i>	34.89	32.59	33.28							
<i>stx2b</i>	35.03	33.66	33.95	92.64						
<i>stx2c</i>	34.66	32.29	32.61	98.41	93.03					
<i>stx2d</i>	34.42	32.21	33.03	98.31	93.29	98.55				
<i>stx2e</i>	36.59	35.24	35.80	91.81	88.84	91.51	91.64			
<i>stx2f</i>	30.74	31.20	32.79	60.70	60.48	60.47	60.22	67.17		
<i>stx2g</i>	36.36	34.86	34.54	93.90	91.25	93.43	93.68	91.82	62.60	

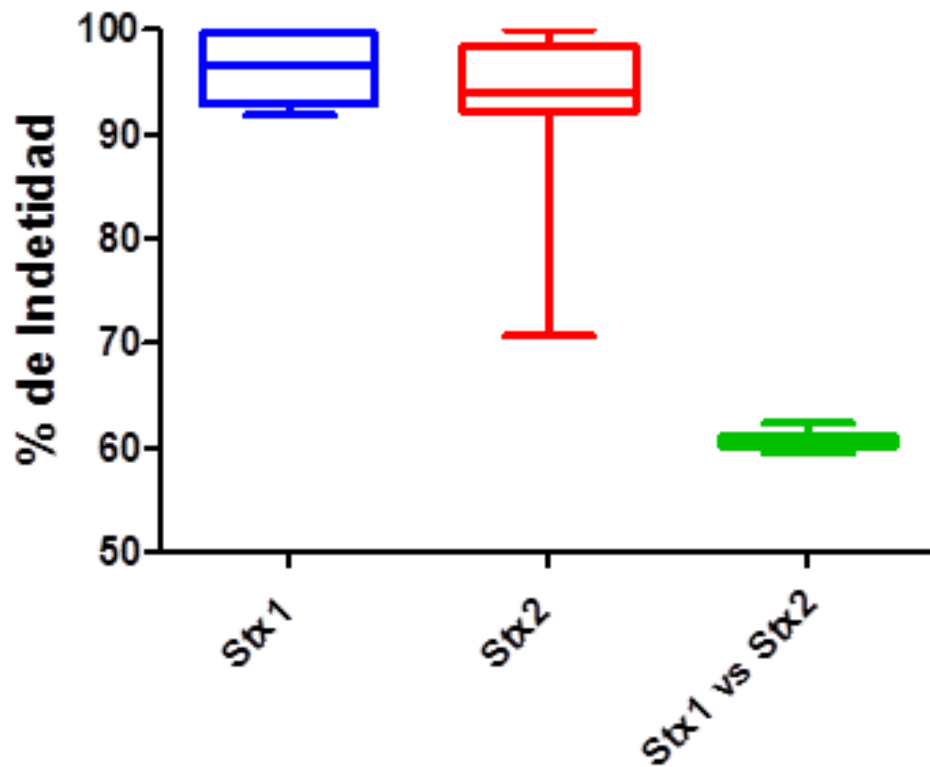


Figura 2. Homología de las secuencias de *stx*. Análisis del porcentaje de identidad de las secuencias *stx1* (28) y *stx2* (98) dentro de cada tipo de *stx* y entre ellos (*stx1* vs *stx2*). La caja agrupa el 50% de los valores y la línea que la divide es la mediana de las muestras. Las barras marcan los valores máximos y mínimos.

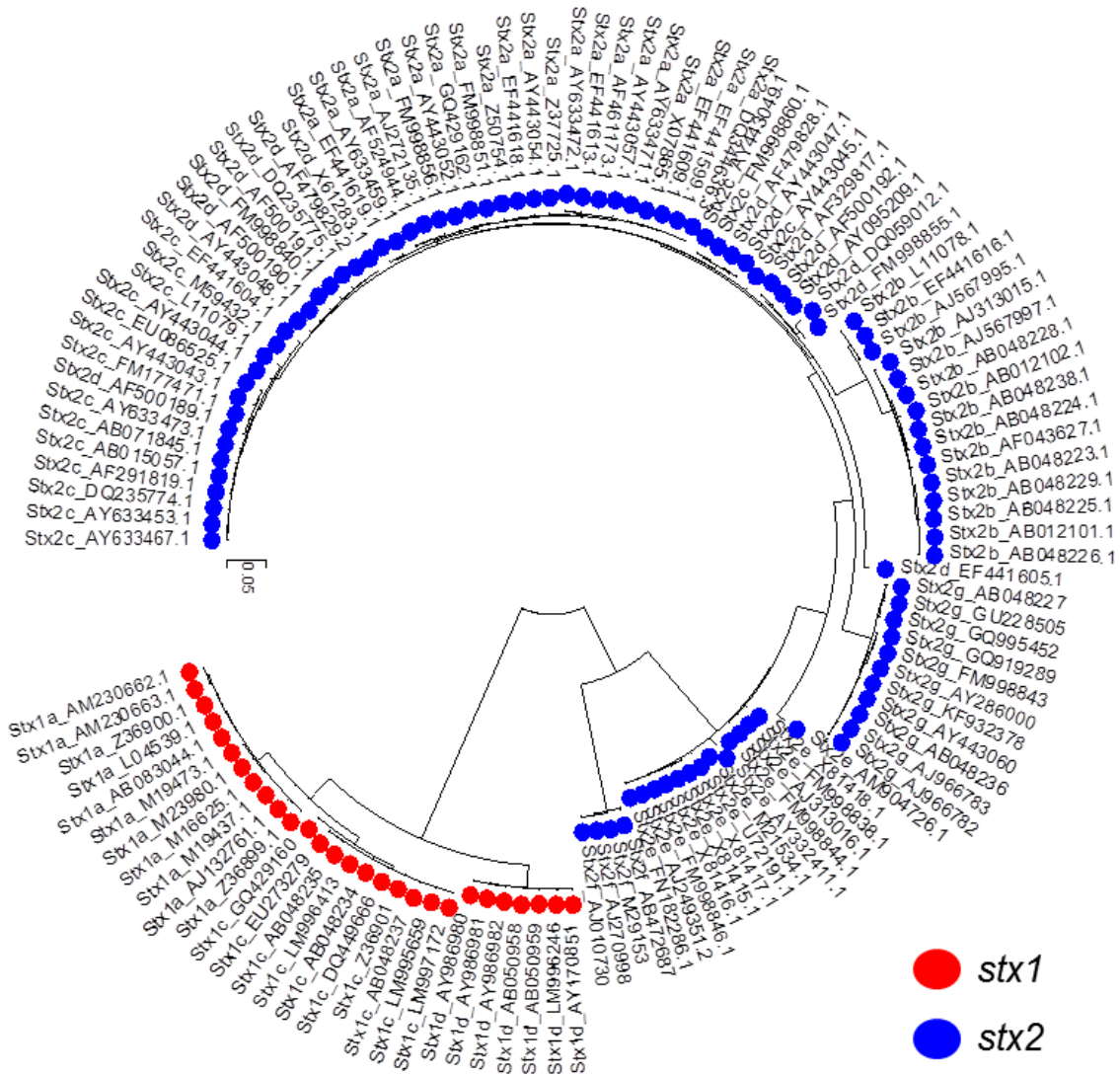


Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias de *stx*. Análisis filogenético Maximum-Likelihood de las 126 secuencias (Cuadro 6) contenidas en nuestra base de datos. Se señalan el subtipo y el número de acceso en el GenBank de la secuencia.

VI.2 Especificidad de los iniciadores de PCR para la detección del gen *stx*.

El análisis de PCR *in silico*, reveló que de los 14 pares de iniciadores de PCR (**Cuadro 4**), los iniciadores con mayor número de aciertos fueron Scheutz1 para *stx1* (26/26 aciertos) y Cebula2 y Lin para *stx2* (93/98 aciertos), fueron los más específicos para detectar la diversidad de *stx* (**Cuadro 8**). Debido a que los iniciadores Lin también reconocen secuencias del gen *stx1*, fueron descartados para este estudio.

Cuadro 8. Porcentaje de efectividad de los pares de iniciadores reportados para la detección de *stx in silico*.

<i>stx1</i>		<i>stx2</i>	
Iniciadores	Aciertos en Primer-Blast (%)	Iniciadores	Aciertos en Primer-Blast (%)
Scheutz 1	100	Scheutz 2A	82.65
Lee 1A	75	Scheutz 2B*	13.27
Lee 1B	0	Scheutz 2C [‡]	4.08
Lin	39.28	Lee 2A	71.43
Pass 1	92.85	Lee 2B	0
Cebula 1	75	Lin	94.90
		Pass 2A	80.61
		Pass 2B*	13.27
		Cebula 2	94.90

*Secuencias reconocidas del gen *stx2e* = 92.85%. ‡Secuencias reconocidas del gen *stx2f* = 100%.

VI.3 Muestreo piloto de colecta de materia orgánica con el sistema de hisopos de arrastre.

La metodología descrita para procesar los hisopos de arrastre, permitió recuperar en promedio 2.7 g de materia orgánica (**Figura 4**), material suficiente para producir 10 alícuotas de muestra para extracción de DNA. El sistema de hisopos de arrastre es ampliamente utilizado para muestreos microbiológicos de bacterias patógenas en unidades de producción (Molla *et al.*, 2010; Rahn *et al.*, 1997; Uesugi *et al.*, 2007; Shipp & Dickson, 2012; Zewde *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta donde conocemos, esta es la primera vez que se estandariza esta técnica para colección de muestras sometidas a ensayos cultivo-independientes.

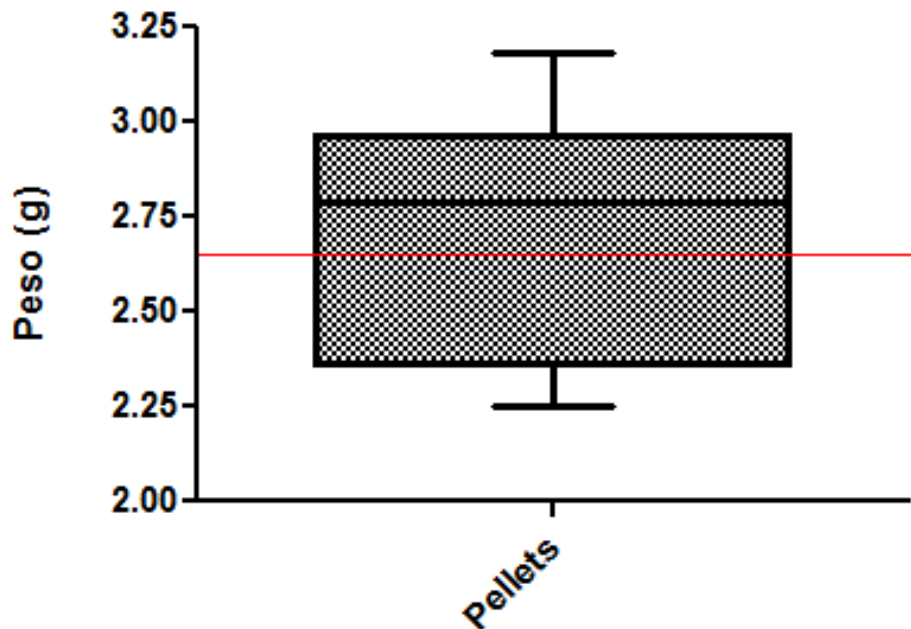


Figura 4. Cantidad de materia orgánica recuperada de los hisopos de arrastre. La caja agrupa el 50% de los valores y la línea que la divide es la mediana de las muestras. Las barras marcan los valores máximos y mínimos y la línea roja el peso promedio de los pellets (2.71556). n = 18 pellets.

VI.4 Selección de la Taq-DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes *stx1* y *stx2* a partir de muestras de excretas.

Para reducir la concentración de sustancias inhibitorias de la PCR, el DNA fue diluido en proporciones 1:10, 1:30 y 1:80. Independientemente de la enzima utilizada, la dilución 1:10 mostró una mejor amplificación del material genético. A este nivel de dilución, la concentración de DNA se estimó a ~10 ng/uL. Por tal motivo estudios subsecuentes utilizaron este nivel de dilución y concentración de DNA.

El ensayo de evaluación de la efectividad de la Taq-DNA polimerasa, reveló que la marca TaKaRa fue capaz de detectar la presencia de los genes *stx1* y *stx2* en DNA proveniente de excretas inoculadas con 2×10^4 UFC de STEC. En contraste, la marca Thermo Scientific solamente detectó *stx1* y *stx2* en excretas inoculadas con 2×10^6 UFC de STEC (**Figura 5**). En base a estos resultados, se seleccionó la marca comercial TaKaRa para el método de detección directa. Esta enzima es comúnmente utilizada para amplificar genes a partir de DNA obtenido de muestras ricas en sustancias inhibitorias (Nava *et al.*, 2012b; Nava *et al.*, 2012a; Bloom *et al.*, 2011; Ciorba *et al.*, 2012).

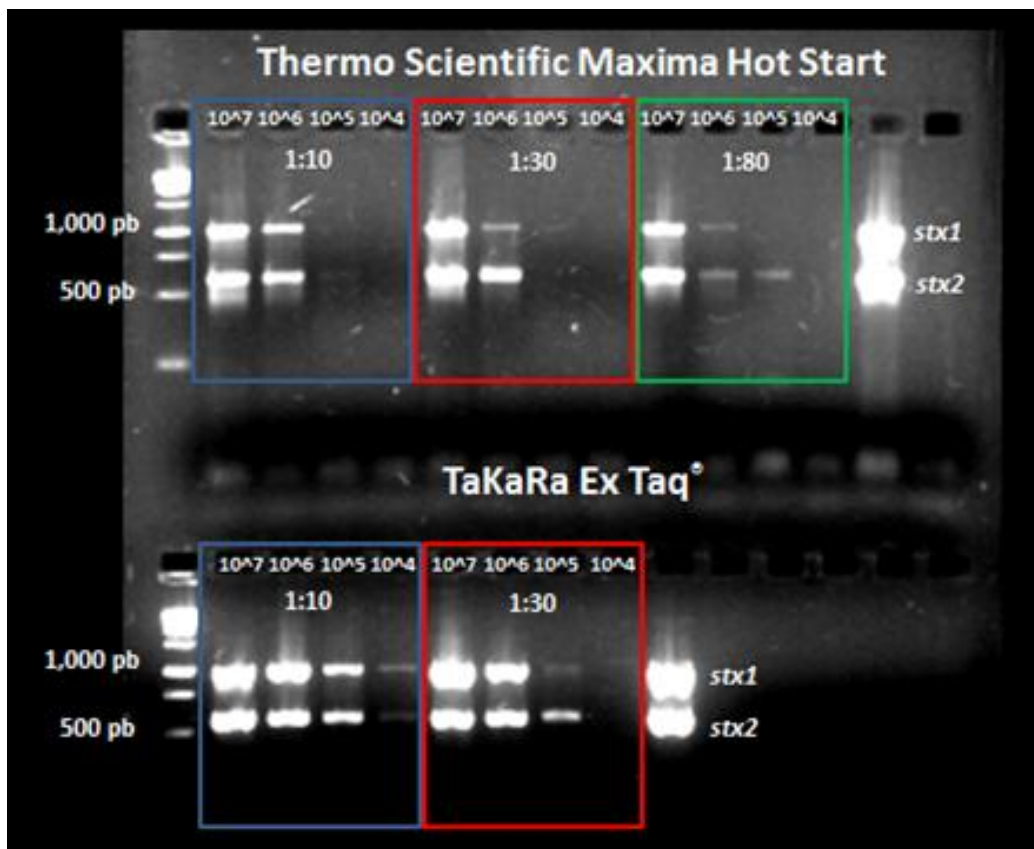


Figura 5. Selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes *stx1* y *stx2*. Detección del gen *stx1* y *stx2* a diferentes concentraciones de EDL 933/g de materia orgánica con diferentes factores dilución del DNA comparando las enzimas comerciales *TaKaRa Ex Taq Hot Start Version* y *Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase*. Los productos se corrieron en un gel de agarosa a una concentración de 1.5%.

VI.5 Límite de detección de los genes *stx1* y *stx2* en heces.

Debido a que en algunas muestras se observó la presencia de productos inespecíficos de la PCR, se realizó un ensayo de gradiente de temperatura. El rango de temperaturas utilizado en el ensayo fue de 48.6 a 65.4°C. El par de iniciadores Scheutz1 que amplifica el gen *stx1* mostró un mayor rango de temperaturas de alineación de PCR sin la formación de artefactos. En contraste, los iniciadores Cebula2 presentan productos inespecíficos en las temperaturas que van de 48.6 a 56.2°C. Sin embargo, a temperaturas de 57.4°C la amplificación del gen *stx2* fue específica (**Figura 6B**). Además, los amplicones más intensos se

observaron a una temperatura de alineación de 61°C. En base a estos resultados, los ensayos subsecuentes de PCR para la detección de *stx1* y *stx2* se realizaron con temperatura de alineación de 61°C.

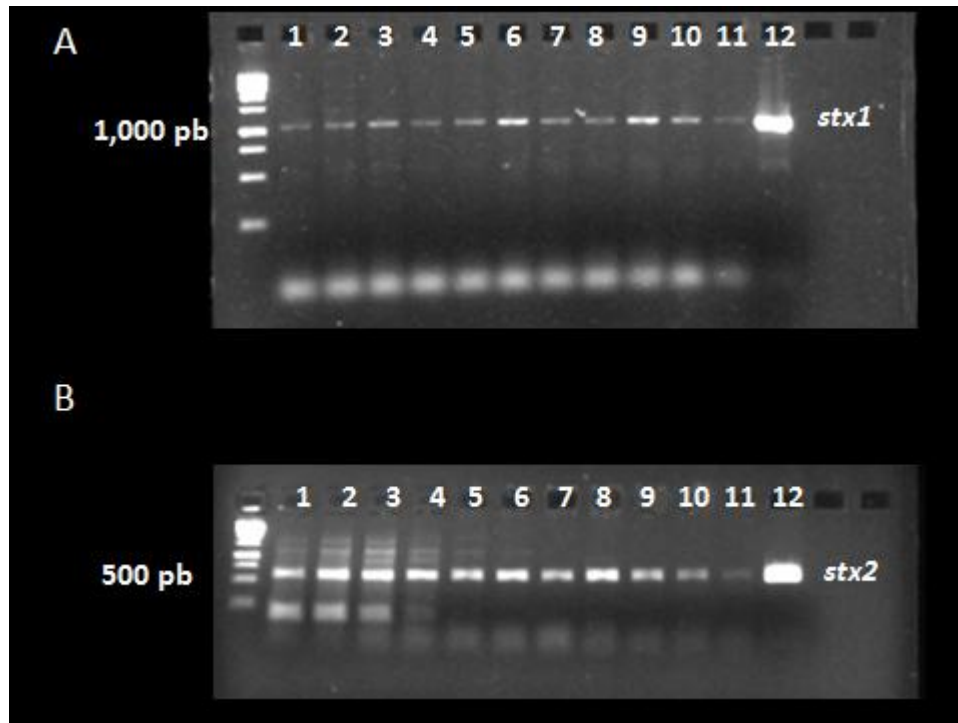


Figura 6. Gradiente de temperatura ($57 \Delta 20^\circ\text{C}$) para la optimización de la PCR. Se utilizó el DNA de EDL 933 inoculado en materia orgánica a una concentración de 20,000 UFC. A) PCR con gradiente de temperatura para los iniciadores Scheutz1. B) PCR con gradiente de temperatura para los iniciadores Cebula2. Cada uno de los carriles representa una T ($^\circ\text{C}$) específica a la que se realizó la PCR. Carril 1 = 48.6; carril 2 = 49.6; carril 3 = 51.3; carril 4 = 53.2; carril 5 = 54.5; carril 6 = 56.2; carril 7 = 57.4; carril 8 = 60.2; carril 9 = 61.3; carril 10 = 63.6; carril 11 = 65.4; carril 12 = 56.2 (Control positivo, DNA genómico puro). Los productos se corrieron en un gel de agarosa a una concentración de 1.5%.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de PCR, se realizó un nuevo ensayo de límite de detección. En este ensayo se inocularon excretas con concentraciones conocidas de STEC (de 2×10^1 a 2×10^4 UFC/0.25 g).

Estos resultados revelan que el límite de detección del ensayo de PCR para la identificación de los genes de *stx1* y *stx2* es 2×10^2 UFC de EDL 933/0.25 g de materia orgánica (**Figura 7**). Esta concentración bacteriana es la carga

bacteriana comúnmente excretada por animales en producción (Sekse *et al.*, 2005; Fegan *et al.*, 2004; Chase-Topping *et al.*, 2008). Por tal motivo, el ensayo directo de PCR para la detección de *stx1* y *stx2* podría ser una herramienta importante para estudiar la prevalencia y distribución de STEC en animales destinados al consumo humano.

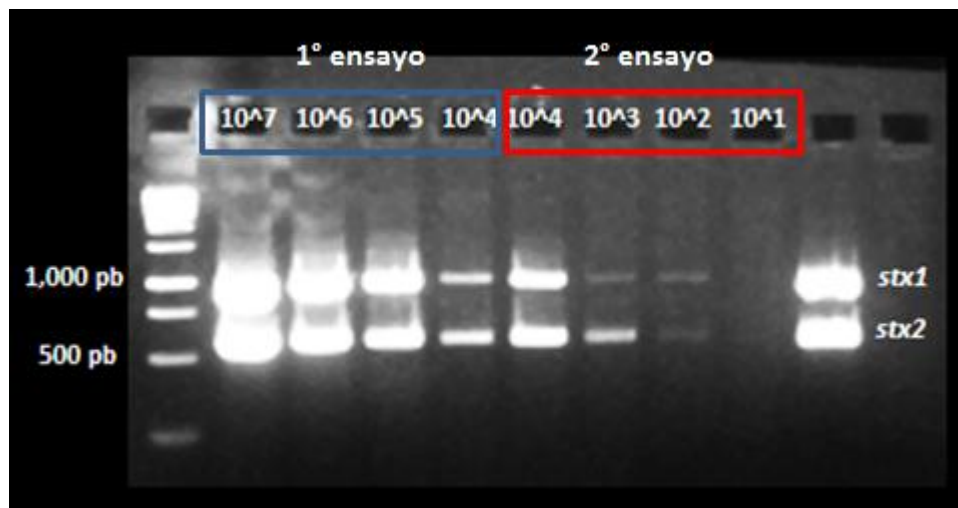


Figura 7. Estandarización del límite de sensibilidad de la PCR para detectar *stx1* y *stx2* a diferentes concentraciones. Detección del gen *stx1* y *stx2* a diferentes concentraciones de EDL 933/g de materia orgánica con diferentes. Los productos se corrieron en un gel de agarosa a una concentración de 1.5%.

VI.6 Prevalencia de los genes *stx1* y *stx2* en hatos de explotación pecuaria.

Los estudios cultivo-dependientes de prevalencia de STEC en productos agroalimentarios son costosos y demoran más de 48 horas para obtener resultados. Por esta razón, surge la necesidad de desarrollar metodologías rápidas para la oportuna identificación de este patógeno (Bélangier *et al.*, 2002; Sekse *et al.*, 2005; Gryns *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2013; Tunsjø *et al.*, 2015). El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método directo para la detección de STEC en muestras ambientales. Este método consiste en la colección de excretas, extracción de DNA y amplificación de los genes *stx1* y *stx2* a través de ensayos de PCR.

Para validar el método de detección directa desarrollado en el presente estudio, se procesaron 85 muestras provenientes de siete unidades de producción animal. El 81.17% (69/85) de las muestras fueron positivas para *stx*. La prevalencia de *stx1*, *stx2* y *stx1/stx2* fue 7.05%, 52.94% y 21.17%, respectivamente. En general, el gen *stx2* fue el más prevalente en todas las unidades de producción animal.

La unidad de producción con mayor prevalencia de *stx* fueron granjas lecheras con 92.5% (37/40), donde el gen *stx2* fue el más recurrente con un 55% (22/40). En granjas de cerdos se observó una prevalencia de *stx* de 81.81% (27/33), siendo el gen *stx2* el más recurrente (63.63%, 21/33). En granjas de becerros de engorda la prevalencia de *stx* fue del 41.66% (5/12), *stx1/stx2* fue el genotipo más recurrente con un 25% (3/12) (**Cuadro 9**). Los resultados obtenidos son comparables con lo reportado en la literatura. Por ejemplo, en ganado bovino se han reportado prevalencias que oscilan entre 3% y 87% (Cho *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010; Menrath *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2014; Mekata *et al.*, 2014). Estos datos sugieren que esta especie animal es un importante reservorio de STEC. De igual forma, otros estudios han reportado altas prevalencia del *stx2* en ganado porcino (Feder *et al.*, 2003; Tseng *et al.*, 2014) Por ejemplo, Tseng y colaboradores, reportaron una prevalencia de 98.59% en canales de cerdo (Tseng *et al.*, 2015). La detección oportuna de *stx2* en productos agroalimentarios es altamente relevante debido a que STEC portadoras de *stx2*, se han asociado a la producción de HUS (Keir *et al.*, 2012; (Ethelberg *et al.*, 2004; Orth *et al.*, 2007).

Los actuales sistemas de producción de alimentos demandan herramientas rápidas para la oportuna identificación de STEC en alimentos y materias primas. Por tal motivo, numerosos investigadores han diseñado ensayos de detección directa (cultivo-independientes) para conocer la prevalencia de STEC en muestras ambientales, Por ejemplo, Seske y colaboradores lograron implementar una técnica de PCR para heces de ovejas, cuyo rango de detección para los genes *stx* fue de 10^2 a 10^7 UFC de STEC/g de excretas (Sekse *et al.*, 2005). En humanos, ensayos moleculares han logrado detectar STEC en niveles que van desde 10^5 a 10^2 UFC/g de heces (Bélanger *et al.*, 2002; Lima *et al.*,

2013; Grys *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2013; Tunsjø *et al.*, 2015). Es estudios resaltan la sensibilidad y la importancia de los ensayos directos. Por tal motivo, esperamos que la herramienta desarrollada en el presente estudio sea fundamental para determinar la prevalencia y diversidad de STEC en productos agroalimentarios.

En México, sólo existe un estudio que haya detectado la presencia de STEC en granjas utilizando la metodología tradicional de aislamiento bacteriano y genotipificación de *stx*. Este ensayo fue realizado en el Valle de Culiacán, Sinaloa, en granjas rurales de ovejas, bovinos y gallinas. Se reportó una prevalencia de STEC de 15.83% (19/120 muestras). De los aislamientos de STEC obtenidos, el 52.38% (33/63 aislamientos) portaban el gen *stx2*, 44.44% (28/63) los genes *stx1/stx2* y el 3.17% (2/63) al gen *stx1* (Amézquita-López *et al.*, 2012). En conjunto, estos datos revelan que en nuestro país circulan los dos tipos de *stx*. Se requieren un estudio más extenso para determinar la prevalencia de STEC en los diferentes grupos agroalimentarios del país. Además, es necesario realizar estudios adicionales para establecer asociaciones entre los diferentes subtipos y las unidades de producción animal.

Cuadro 9. Prevalencia de los genes *stx1* y *stx2* para los diferentes tipos de granjas muestreados.

Granja	Gen de la toxina			Total
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i> y <i>stx2</i>	
Cerdos	3/33 (9.09%)	21/33 (63.63%)	3/33 (9.09%)	27/33 (81.81%)
Vacas lecheras	3/40 (7.50%)	22/40 (55%)	12/40 (30%)	37/40 (92.5%)
Beceros de engorda	0/12 (0%)	2/12 (16.66%)	3/12 (25%)	5/12 (41.66%)
Total	6/85 (7.05%)	45/85 (52.94%)	18/85 (21.17%)	69/85 (81.17%)

VII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se desarrolló y validó un ensayo de detección de directa de los genes *stx1* y *stx2*, con un límite de detección de 10^2 UFC de STEC. Este método es rápido y sensible para estudiar la prevalencia y distribución de este *stx* en unidades de producción animal.

En las muestras analizadas no se observó una relación entre la diversidad de *stx* y las especies animales en producción. Sin embargo, se corroboró que el grupo *stx2* es más prevalente prevalencia en cerdos y ganado vacuno. Este hallazgo es importante, debido al daño que producen las STEC Stx2 en humanos.

En general, la presencia de los genes de virulencia de STEC en granjas de animales de producción es preocupante, por el riesgo potencial en humanos. Por tal motivo, es imperativo realizar un estudio más extenso para conocer la prevalencia y diversidad de STEC en productos agroalimentarios y establecer medidas zoonatiras de prevención y control. Consideramos que la herramienta molecular desarrollada en el presente estudio será de gran importancia para este fin.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Allison, H. E. 2007. Stx-phages: drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiol.* 2:165–174.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.
- Amézquita-López, B. A., B. Quiñones, M. B. Cooley, J. León-Félix, N. Castro-del Campo, R. E. Mandrell, M. Jiménez, and C. Chaidez. 2012. Genotypic Analyses of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Recovered from Feces of Domestic Animals on Rural Farms in Mexico. *PLoS ONE* 7:e51565.
- Bai, X., H. Wang, Y. Xin, R. Wei, X. Tang, A. Zhao, H. Sun, W. Zhang, Y. Wang, Y. Xu, Z. Zhang, Q. Li, J. Xu, and Y. Xiong. 2015. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. *Int. J. Food Microbiol.* 200:31–38.
- Bélanger, S. D., M. Boissinot, C. Ménard, F. J. Picard, and M. G. Bergeron. 2002. Rapid Detection of Shiga Toxin-Producing Bacteria in Feces by Multiplex PCR with Molecular Beacons on the Smart Cycler. *J. Clin. Microbiol.* 40:1436–1440.
- Bergan, J., A. B. Dyve Lingelem, R. Simm, T. Skotland, and K. Sandvig. 2012. Shiga toxins. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* 60:1085–1107.
- Bloom, S. M., V. N. Bijanki, G. M. Nava, L. Sun, N. P. Malvin, D. L. Donermeyer, W. M. Dunne, P. M. Allen, and T. S. Stappenbeck. 2011. Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe* 9:390–403.
- CDC - 2011 Estimates of Foodborne Illness. Available from: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>

- Chase-Topping, M., D. Gally, C. Low, L. Matthews, and M. Woolhouse. 2008. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:904–912.
- Cho, S., C. P. Fossler, F. Diez-Gonzalez, S. J. Wells, C. W. Hedberg, J. B. Kaneene, P. L. Ruegg, L. D. Warnick, and J. B. Bender. 2009. Cattle-level risk factors associated with fecal shedding of Shiga toxin-encoding bacteria on dairy farms, Minnesota, USA. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Vét.* 73:151–156.
- Ciorba, M. A., T. E. Riehl, M. S. Rao, C. Moon, X. Ee, G. M. Nava, M. R. Walker, J. M. Marinshaw, T. S. Stappenbeck, and W. F. Stenson. 2012. *Lactobacillus* probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclooxygenase-2-dependent manner. *Gut* 61:829–838.
- Dipineto, L., A. Santaniello, M. Fontanella, K. Lagos, A. Fioretti, and L. F. Menna. 2006. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Lett. Appl. Microbiol.* 43:293–295.
- Dutta, T. K., P. Roychoudhury, S. Bandyopadhyay, S. A. Wani, and I. Hussain. 2011. Detection & characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) & enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in poultry birds with diarrhoea. *Indian J. Med. Res.* 133:541–545.
- Endo, Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara, and K. Igarashi. 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem. FEBS* 171:45–50.
- Etcheverría, A. I., and N. L. Padola. 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence* 4:366–372.
- Ethelberg, S., K. E. P. Olsen, F. Scheutz, C. Jensen, P. Schiellerup, J. Engberg, A. M. Petersen, B. Olesen, P. Gerner-Smidt, and K. Mølbak. 2004. Virulence

Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark¹. *Emerg. Infect. Dis.* 10:842–847.

Eurosurveillance editorial team. 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 has been published. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 18:20449.

Feder, I., F. M. Wallace, J. T. Gray, P. Fratamico, P. J. Fedorka-Cray, R. A. Pearce, J. E. Call, R. Perrine, and J. B. Luchansky. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Intact Colon Fecal Samples of Swine¹. *Emerg. Infect. Dis.* 9:380–383.

Fegan, N., P. Vanderlinde, G. Higgs, and P. Desmarchelier. 2004. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 97:362–370.

Feng, P., S. D. Weagant, and K. Jinneman. 2015. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 4A. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Available from: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/edeb/reports.html#Shiga>

Fernández, D., K. Irino, M. E. Sanz, N. L. Padola, and A. E. Parma. 2010. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 51:377–382.

Ferreira, M. R. A., E. G. F. Filho, J. F. N. Pinto, M. Dias, and C. N. Moreira. 2014. Isolation, prevalence, and risk factors for infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 46:635–639.

Fuller, C. A., C. A. Pellino, M. J. Flagler, J. E. Strasser, and A. A. Weiss. 2011. Shiga Toxin Subtypes Display Dramatic Differences in Potency. *Infect. Immun.* 79:1329–1337.

- Gerd Christensen, E., T. Rask Licht, T. Dyrmann Leser, and M. Iain Bahl. 2014. Dietary Xylo-oligosaccharide stimulates intestinal bifidobacteria and lactobacilli but has limited effect on intestinal integrity in rats. *BMC Res. Notes* 7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4179812/>
- Grys, T. E., L. M. Sloan, J. E. Rosenblatt, and R. Patel. 2009. Rapid and Sensitive Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Nonenriched Stool Specimens by Real-Time PCR in Comparison to Enzyme Immunoassay and Culture. *J. Clin. Microbiol.* 47:2008–2012.
- Gyles, C. L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85:E45–62.
- Gyles, C. L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85:E45–62.
- Hald, T. 2013. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. Available from: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3138.pdf
- Jacewicz, M., H. Clausen, E. Nudelman, A. Donohue-Rolfe, and G. T. Keusch. 1986. Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *J. Exp. Med.* 163:1391–1404.
- Johannes, L., and W. Römer. 2010. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:105–116.
- Johnson, S. S., M. G. Chevrette, B. L. Ehlmann, and K. C. Benison. 2015. Insights from the Metagenome of an Acid Salt Lake: The Role of Biology in an Extreme Depositional Environment. *PLoS ONE* 10:e0122869.

- Keir, L. S., S. D. Marks, and J. J. Kim. 2012. Shigatoxin-associated hemolytic uremic syndrome: current molecular mechanisms and future therapies. *Drug Des. Devel. Ther.* 6:195–208.
- Kishino, H., and M. Hasegawa. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J. Mol. Evol.* 29:170–179.
- Lainhart, W., G. Stolfa, and G. B. Koudelka. 2009. Shiga Toxin as a Bacterial Defense against a Eukaryotic Predator, *Tetrahymena thermophila*. *J. Bacteriol.* 191:5116–5122.
- Lima, I. F. N., J. D. S. Quetz, R. L. Guerrant, J. P. Nataro, E. R. Houpt, A. A. M. Lima, and A. Havt. 2013. Enteroaggregative *Escherichia coli* quantification in children stool samples using quantitative PCR. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 121:643–651.
- Los, J. M., M. Los, A. Wegrzyn, and G. Wegrzyn. 2013. Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:166.
- Majowicz, S. E., E. Scallan, A. Jones-Bitton, J. M. Sargeant, J. Stapleton, F. J. Angulo, D. H. Yeung, and M. D. Kirk. 2014. Global incidence of human Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog. Dis.* 11:447–455.
- Mekata, H., A. Iguchi, K. Kawano, Y. Kirino, I. Kobayashi, and N. Misawa. 2014. Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. *J. Food Prot.* 77:1269–1274.
- Mele, C., G. Remuzzi, and M. Noris. 2014. Hemolytic uremic syndrome. *Semin. Immunopathol.* 36:399–420.

- Menrath, A., L. H. Wieler, K. Heidemanns, T. Semmler, A. Fruth, and N. Kemper. 2010. Shiga toxin producing *Escherichia coli*: identification of non-O157:H7-Super-Shedding cows and related risk factors. *Gut Pathog.* 2:7.
- Molla, B., A. Sterman, J. Mathews, V. Artuso-Ponte, M. Abley, W. Farmer, P. Rajala-Schultz, W. E. M. Morrow, and W. A. Gebreyes. 2010. *Salmonella enterica* in commercial swine feed and subsequent isolation of phenotypically and genotypically related strains from fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7188–7193.
- Nava, G. M., F. Carbonero, J. A. Croix, E. Greenberg, and H. R. Gaskins. 2012a. Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in the healthy human colon. *ISME J.* 6:57–70.
- Nava, G. M., F. Carbonero, J. Ou, A. C. Benefiel, S. J. O’Keefe, and H. R. Gaskins. 2012b. Hydrogenotrophic microbiota distinguish native Africans from African and European Americans. *Environ. Microbiol. Rep.* 4:307–315.
- Oliveira, M. G., J. R. F. Brito, T. A. T. Gomes, B. E. C. Guth, M. A. M. Vieira, Z. V. F. Naves, T. M. I. Vaz, and K. Irino. 2008. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 127:139–146.
- Orth, D., K. Grif, A. B. Khan, A. Naim, M. P. Dierich, and R. Würzner. 2007. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59:235–242.
- Piérard, D., G. Muyldermans, L. Moriau, D. Stevens, and S. Lauwers. 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:3317–3322.
- Rahn, K., S. A. Renwick, R. P. Johnson, J. B. Wilson, R. C. Clarke, D. Alves, S. McEwen, H. Lior, and J. Spika. 1997. Persistence of *Escherichia coli*

O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiol. Infect.* 119:251–259.

Scheutz, F., L. D. Teel, L. Beutin, D. Piérard, G. Buvens, H. Karch, A. Mellmann, A. Caprioli, R. Tozzoli, S. Morabito, N. A. Strockbine, A. R. Melton-Celsa, M. Sanchez, S. Persson, and A. D. O'Brien. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50:2951–2963.

Schmitt, C. K., M. L. McKee, and A. D. O'Brien. 1991. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect. Immun.* 59:1065–1073.

Sekse, C., A. Solberg, A. Petersen, K. Rudi, and Y. Wasteson. 2005. Detection and quantification of Shiga toxin-encoding genes in sheep faeces by real-time PCR. *Mol. Cell. Probes* 19:363–370.

Shipp, G., and J. Dickson. 2012. A Longitudinal Study of the Establishment and Proliferation of *Enterococcus* on a Dairy Farm. *Foodborne Pathog. Dis.*:425–430.

Sonntag, A.-K., M. Bielaszewska, A. Mellmann, N. Dierksen, P. Schierack, L. H. Wieler, M. A. Schmidt, and H. Karch. 2005a. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8855–8863.

Sonntag, A.-K., E. Zenner, H. Karch, and M. Bielaszewska. 2005b. Pigeons as a possible reservoir of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* pathogenic to humans. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 118:464–470.

- Steinberg, K. M., and B. R. Levin. 2007. Grazing protozoa and the evolution of the *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding prophage. *Proc. Biol. Sci.* 274:1921–1929.
- Stolfa, G., and G. B. Koudelka. 2013. Entry and Killing of *Tetrahymena thermophila* by Bacterially Produced Shiga Toxin. *mBio* 4:e00416–12.
- Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien. 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* 53:135–140.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipowski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729.
- Tilden, J., W. Young, A. M. McNamara, C. Custer, B. Boesel, M. A. Lambert-Fair, J. Majkowski, D. Vugia, S. B. Werner, J. Hollingsworth, and J. G. Morris. 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health* 86:1142–1145.
- Tseng, M., P. M. Fratamico, L. Bagi, S. Delannoy, P. Fach, S. D. Manning, and J. A. Funk. 2014. Diverse Virulence Gene Content of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Finishing Swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:6395–6402.
- Tseng, M., P. M. Fratamico, L. Bagi, D. Manzinger, and J. A. Funk. 2015. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. *Epidemiol. Infect.* 143:505–514.
- Tunsgj, H. S., A. K. Kvissel, B. Follin-Arbelet, B.-M. Brotnov, T. E. Ranheim, and T. M. Leegaard. 2015. Suitability of stx-PCR directly from fecal samples in clinical diagnostics of STEC. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 123:872–878.

- Uesugi, A. R., M. D. Danyluk, R. E. Mandrell, and L. J. Harris. 2007. Isolation of *Salmonella* Enteritidis phage type 30 from a single almond orchard over a 5-year period. *J. Food Prot.* 70:1784–1789.
- Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien. 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* 170:4223–4230.
- Willshaw, G. ., J. Thirlwell, A. p. Jones, S. Parry, R. I. Salmon, and M. Hickey. 1994. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:304–307.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. L. Madden. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134.
- Zewde, B. M., R. Robbins, M. J. Abley, B. House, W. E. M. Morrow, and W. A. Gebreyes. 2009. Comparison of Swiffer wipes and conventional drag swab methods for the recovery of *Salmonella* in swine production systems. *J. Food Prot.* 72:142–146.
- Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, and H. Karch. 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 40:1441–1446.