



INFORME BREVE

Efectos del medio de cultivo y de la metodología aplicada sobre la formación de biopelículas de 2 cepas de *Escherichia coli* diarreagénicas

María E. Cáceres, Analía I. Etcheverría* y Nora L. Padola

Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología-CIVETAN, CONICET, CICPBA, Facultad de Ciencias, Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 9 de noviembre de 2017; aceptado el 8 de abril de 2018
Disponible en Internet el 19 de enero de 2019

PALABRAS CLAVE

Escherichia coli
verotoxigénica;
Escherichia coli
enteropatógena;
Biopelícula;
Metodología;
Medios de cultivo

KEYWORDS

Verotoxigenic
Escherichia coli;
Enteropathogenic
Escherichia coli;
Biofilm;
Methodology;
Culture medium

Resumen La capacidad de formar biopelículas de los microorganismos patógenos en gran variedad de ambientes, superficies y condiciones trae consigo un importante riesgo, tanto para la industria alimentaria como para la salud pública. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar y comparar los efectos de la metodología empleada y de los medios de cultivo utilizados, sobre la capacidad de una cepa de *Escherichia coli* verotoxigénica no O157 y una enteropatógena de formar biopelículas sobre una superficie de poliestireno. Se ensayaron 2 variantes metodológicas en cultivo estático y se utilizaron medios de cultivo con diferente composición. Los resultados mostraron que ambas cepas formaron una mayor cantidad de biopelícula en cultivo en LB suplementado con glucosa, con recambio del medio a las 24 h y la cuantificación de la biopelícula realizada a las 48 h de incubación. Dichas condiciones podrían ser utilizadas en futuros estudios sobre formación de biopelícula.

© 2018 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Effects of the culture medium and the methodology applied on the biofilm formation of 2 diarrheagenic *Escherichia coli* strains

Abstract The ability to form biofilms of pathogenic microorganisms in a wide variety of environments, surfaces and conditions constitute an important risk, both for the food industry and for public health. The aim of this work was to evaluate and to compare the effects of the methodology applied and the culture medium used on the ability of a non-O157 verotoxigenic *Escherichia coli* strain and an enteropathogenic strain to form biofilm on polystyrene surface.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: analai@vet.unicen.edu.ar (A.I. Etcheverría).

Two methodological variants were tested in static culture and culture mediums with different composition were used. The results showed that both strains were able to form a greater biofilm under culture in LB supplemented with glucose, with medium replacement at 24 h and the quantification of the biofilm carried out at 48 h of incubation. These conditions could be used in future studies on biofilm formation.

© 2018 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Asociación Argentina de Microbiología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Escherichia coli verotoxigénica (VTEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) son importantes patógenos relacionados con la salud pública.

VTEC puede causar colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH), el que afecta especialmente a niños menores de 5 años, personas mayores y pacientes inmunocomprometidos¹¹. El ganado bovino de diferentes sistemas de producción ha sido identificado como el principal reservorio de VTEC^{9,13}. Diversos alimentos, como la carne, la leche y sus subproductos, así como los jugos de fruta sin pasteurizar y el agua contaminada, son las principales vías de contagio en brotes y casos esporádicos de SUH¹¹. También debe considerarse el contagio por contacto directo persona a persona o por contacto directo o indirecto con heces bovinas y el ambiente de animales.

EPEC se asocia con casos de diarrea infantil aguda o persistente y, al igual que otras *E. coli* diarreagénicas, se transmite por vía fecal-oral a través de manos, agua y alimentos contaminados. El principal reservorio de EPEC es el humano, especialmente los niños con diarrea y los niños o los adultos que son portadores asintomáticos, aunque se ha encontrado, además, en varias especies animales como pollos y alimentos derivados¹.

En el entorno natural, la mayor parte de los microorganismos viven en comunidades adheridas a una superficie biótica o abiótica, o formando conglomerados dispersos denominados biopelículas. Estas comunidades de células sésiles crecen embebidas en una matriz orgánica polimérica producida por las propias células y poseen diferencias profundas en cuanto a la tasa de crecimiento y a la transcripción génica respecto de sus contrapartes planctónicas⁷. La biopelícula formada ofrece a los microorganismos distintas ventajas adaptativas: protege de la acción de los agentes adversos, incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilita el aprovechamiento del agua reduciendo la posibilidad de deshidratación y favorece la transferencia de material genético (ADN), entre otras. Estas circunstancias logran incrementar su capacidad de supervivencia frente a condiciones adversas del ambiente natural y frente a métodos habituales de desinfección y la aplicación de antibióticos^{2,15}.

La posibilidad de los microorganismos patógenos de formar biopelícula en variedad de ambientes y condiciones trae consigo un importante riesgo tanto para la industria alimentaria como para la salud pública. En la industria alimentaria es muy común la presencia de biopelículas en cañerías y

equipos compuestos por diferentes materiales (incluyendo plástico, cristal, madera, acero inoxidable) e incluso sobre los alimentos producidos.

Las biopelículas formadas en condiciones favorables pueden proteger a los microorganismos potencialmente patógenos frente a los desinfectantes utilizados para descontaminar los ambientes y las superficies de procesamiento de alimentos². Esto podría causar la contaminación de las materias primas y del producto final, y las consecuencias de dicha contaminación abarcan desde pérdidas económicas hasta el desarrollo de enfermedades.

Diferentes estudios de laboratorio han intentado comprender la dinámica del desarrollo de las biopelículas, las condiciones en que se forman y cómo permanecen en el tiempo. Se sabe que las biopelículas son un punto estable en un ciclo biológico que incluye la iniciación, la maduración, el mantenimiento y la disolución, en el que las bacterias parecen iniciar el desarrollo de la biopelícula en respuesta a señales ambientales específicas, como, por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes⁷. Además del contenido nutricional del medio, otras señales ambientales que pueden influir en la formación de biopelículas son la temperatura, la osmolaridad, el pH, el hierro y el oxígeno^{12,14}.

Se ha informado que algunas cepas de *E. coli* K-12 y *Vibrio cholerae* no crecen en medios mínimos, a menos que sean suplementados con aminoácidos, mientras que *E. coli* O157:H7 se ha considerado mejor formadora de biopelícula en medios con bajo contenido de nutrientes y suplementados con glucosa⁶. Otros estudios indicaron que serotipos VTEC no O157 fueron formadores de biopelícula en medios nutritivos a diferentes temperaturas y sobre distintas superficies¹². De la misma manera, EPEC fue caracterizada como buena formadora de biopelícula sobre poliestireno y vidrio en medios mínimos suplementados con glucosa⁴.

Actualmente, se cuenta con diversas metodologías e instrumentos para la detección y el estudio de biopelículas. Estos procedimientos incluyen desde la observación directa por medio de cultivos continuos, a través de microscopía electrónica o confocal, hasta la observación indirecta a través de cultivos estáticos en microplacas o de la morfología de colonias en medios de cultivo sólidos³.

Dentro de los cultivos en microplacas existen variaciones en cuanto a los medios de cultivo utilizados, las temperaturas de incubación, el inóculo inicial y el análisis de los datos obtenidos, los que tienden a adecuarse según el microorganismo que se desea estudiar^{7,10}. En trabajos

anteriores de nuestra autoría se ha demostrado la diferencia de crecimiento entre medios nutritivos y medios mínimos en cepas VTEC y EPEC sobre superficie de poliestireno⁸, que dieron lugar a otros estudios respecto a los efectos que podría tener la variación de otros factores, como el tiempo de incubación y la técnica aplicada para la evaluación de la formación de biopelícula, aspectos sobre los que se focaliza el presente estudio.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar y comparar los efectos de la metodología aplicada y los medios de cultivo utilizados sobre la capacidad de formar biopelícula sobre una superficie de poliestireno de 2 cepas de *E. coli*, una de ellas VTEC no O157 y la otra EPEC. Ambos aislamientos provinieron del cepario del Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología⁹, estos fueron el O103:H2 (*vt1*, *vt2*, *eae*, *ehxA*, *efa1*, *espP*, *subA*, *fimCD*, *ehaA*, *agn43*) y el O108:H9 (*eaeβ*, *fimCD*).

Se comparó la formación de biopelícula de ambas cepas mediante el uso de 2 metodologías, según lo descripto por Danese et al.⁵ (en adelante, metodología A) y por Villegas et al.¹⁴ (en adelante, metodología B), utilizando 3 medios de cultivo distintos, a saber: a) caldo nutritivo Luria Bertani (LB, Britania); b) caldo LB suplementado con glucosa (Mallinckrodt) al 0,5% (LBglu), y c) medio mínimo suplementado con glucosa al 0,8% (M63). Además, se ensayaron 2 variantes respecto del tiempo total de incubación: 72 h o 48 h.

Cada cepa conservada a -70°C fue reactivada en LB a 37°C *overnight* con agitación (150 rpm). Se midió la densidad óptica (DO) de cada cultivo y se realizaron diluciones ajustando la DO a 0,5 (equivalente a $2,5 \times 10^8$ UFC/ml, aproximadamente). Una alícuota (10 μl) de la dilución apropiada de cada cepa fue sembrada en pocillos que contenían 190 μl de cada medio estéril (LB, LBglu y M63; proporción final 1:20) en 2 microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Corning), a las que se denominó A y B de acuerdo con el tipo de intervención que se practicó en ellas 24 h después. Se señalan a continuación esas intervenciones:

- Metodología A: se tomaron 10 μl de cada pocillo y se sembraron en nuevos pocillos con 190 μl del medio fresco estéril correspondiente (fig. 1, panel superior).
- Metodología B: se retiró todo el contenido de los pocillos y se agregaron 200 μl del medio estéril correspondiente (fig. 1, panel inferior).

A partir de ese momento, las microplacas se continuaron incubando de modo estático a 37°C por 24 o 48 h más, de modo que el tiempo de cultivo total hasta la evaluación de la biopelícula fue de 48 h o de 72 h.

Las placas que fueron expuestas a un tiempo de incubación de 48 h sufrieron, además, una modificación en el medio de cultivo en el cual las bacterias fueron incubadas las primeras 24 h (ambas cepas se sembraron en 190 μl de LB) y al término de ese tiempo se procedió con las intervenciones propuestas.

Las microplacas se revelaron mediante la técnica del cristal violeta (CV). Brevemente, se retiró el contenido de todos

los pocillos, se lavaron con agua bidestilada estéril y se fijaron con 200 μl de metanol (Biopack) durante 15 min a temperatura ambiente. Los pocillos se tiñeron con 200 μl (Microplacas de 96 pocillos Corning, Thermo Fisher Scientific) de CV al 0,1% durante 20 min. El colorante adherido a las biopelículas se eluyó con 200 μl de alcohol 96% y se leyó la DO₅₇₀ en un lector de microplacas Labsystem Multiscan EX (I.C.T, S.L. Instrumentación Científica Técnica, S.L.).

Para cada cepa se utilizaron 3 pocillos consecutivos cuyas DO fueron promediadas y corregidas por una DO de corte, obtenida con la suma del promedio de las DO de los pocillos control (3 pocillos de cada medio estéril no inoculado) y 3 veces su desviación estándar¹⁰. De acuerdo con las DO corregidas, las cepas fueron clasificadas en 4 categorías:

- No formadoras de biopelícula (NFB): $\text{DO}_{\text{corregida}} < \text{DO}_{\text{corte}}$.
- Débiles formadoras de biopelícula (DFB): $\text{DO}_{\text{corte}} \leq \text{DO}_{\text{corregida}} < 2\text{DO}_{\text{corte}}$.
- Moderadas formadoras de biopelícula (MFB): $2\text{DO}_{\text{corte}} \leq \text{DO}_{\text{corregida}} < 4\text{DO}_{\text{corte}}$.
- Fuertes formadoras de biopelícula (FFB): $\text{DO}_{\text{corregida}} \geq 4\text{DO}_{\text{corte}}$.

Se realizaron 2 experimentos independientes que fueron analizados mediante ANOVA con el programa InfoStat 2015e (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para una mejor comprensión de la información, las DO corregidas se expresaron en porcentajes, tomando como 100% la DO promedio de cada cepa. Los porcentajes obtenidos para cada ensayo independiente fueron promediados y se muestran en la tabla 1.

Con un tiempo de incubación total de 72 h (tabla 1, sector izquierdo), se encontraron diferencias significativas en la formación de biopelícula de las 2 cepas con respecto al medio de cultivo utilizado ($p = 0,0316$), independientemente de la metodología empleada ($p = 0,3413$), en este caso los medios LB y LBglu fueron los que promovieron una mayor formación de biopelícula en las cepas VTEC y EPEC, respectivamente ($p < 0,05$). La cepa VTEC se clasificó como DFB en los medios LBglu y M63, y como FFB y MFB en LB (metodología A y B, respectivamente). La cepa EPEC fue considerada como DFB en M63, como MFB en LB y como FFB en LBglu, con las 2 metodologías abordadas.

Con un tiempo de incubación total más corto, de 48 h (tabla 1, sector derecho), no se obtuvieron diferencias significativas respecto del medio de cultivo utilizado ($p = 0,0744$), pero sí respecto de la metodología empleada ($p = 0,0067$): fue la metodología B (con recambio del medio) aquella que permitió un mejor desarrollo de biopelícula. En este caso, la cepa VTEC se mostró como DFB en los 3 medios de cultivo evaluados con la metodología A, pero con la metodología B resultó DFB solo en M63, ya que fue MFB en LB y FFB en LBglu. La cepa EPEC mantuvo un comportamiento similar que con 72 h de incubación y formó más biopelícula en el medio LBglu con ambas metodologías (MFB con metodología A y FFB con la metodología B), pero en este caso la metodología B llevó siempre a una mayor formación de biopelícula. Se debe destacar que ambas cepas resultaron FFB en LBglu con la metodología B y 48 h de incubación. Los datos relacionados con las DO obtenidas para cada tiempo

^a Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

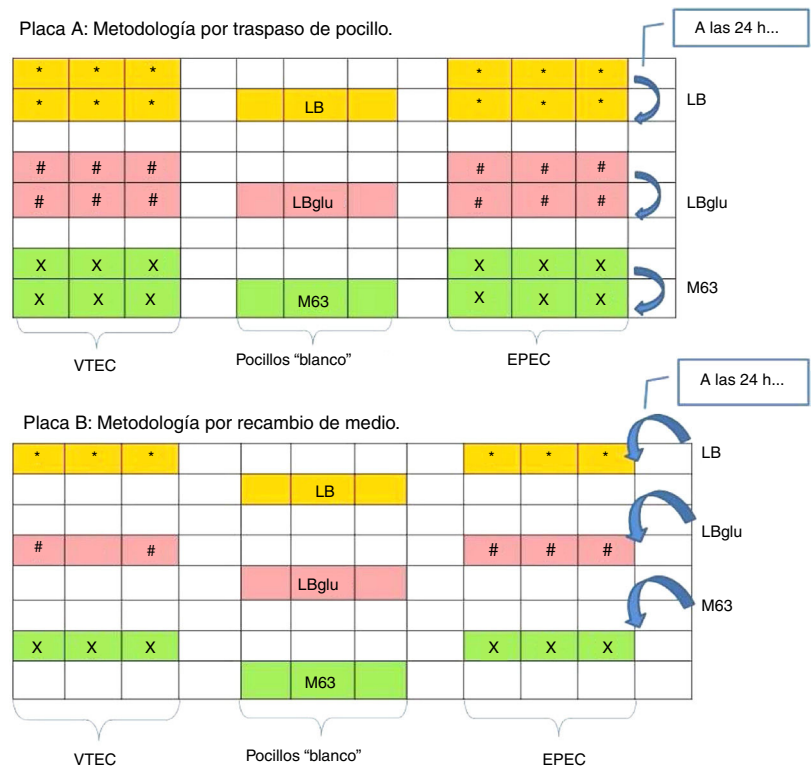


Figura 1 Diseño experimental de las metodologías A y B, con las intervenciones propuestas para cada una.

Tabla 1 Formación de biopelícula en placas de poliestireno de 2 cepas de <i>Escherichia coli</i> , una VTEC y otra EPEC							
Cepa	Metodología	Evaluación a las 72 h			Evaluación a las 48 h		
		Medios de cultivo	Formación de biopelícula (%) ^a	Clasificación	Medios de cultivo	Formación de biopelícula (%) ^a	Clasificación
VTEC	A	LB	81,44	FFB	LB	59,5	DFB
		LBglu	45,70	DFB	LBglu	51,0	DFB
		M63	24,72	DFB	M63	12,6	DFB
	B	LB	75,99	MFB	LB	67,9	MFB
		LBglu	62,97	DFB	LBglu	88,0	FFB
		M63	46,75	DFB	M63	60,7	DFB
EPEC	A	LB	74,49	MFB	LB	48,5	DFB
		LBglu	81,59	FFB	LBglu	70,3	MFB
		M63	49,60	DFB	M63	57,1	DFB
	B	LB	68,50	MFB	LB	75,6	MFB
		LBglu	82,56	FFB	LBglu	89,8	FFB
		M63	64,47	DFB	M63	74,7	MFB

^a El porcentaje mostrado corresponde al promedio de los porcentajes encontrados en cada ensayo independiente.

de incubación y metodología empleada se muestran en el Material Suplementario.

La capacidad para formar biopelículas sobre superficies por parte de microorganismos potencialmente patógenos, como los aquí evaluados, se vincula directamente con la persistencia de estos en el ambiente y con su transmisión⁴. Para evitar el establecimiento de biopelículas y la posible contaminación cruzada es preciso llevar a cabo estrategias de control y mantener buenas prácticas de manufactura. Particularmente en la industria alimentaria, se debe prevenir la deposición de residuos orgánicos y su acumulación en

aquellas superficies, tuberías y utensilios que puedan estar en contacto con los alimentos o las materias primas.

Dentro de la variedad de técnicas que se pueden utilizar para el estudio y la detección de biopelículas, este trabajo evaluó la influencia de la composición de los medios de cultivo que se emplean y 2 metodologías diferentes, ambas en cultivo estático, sobre la formación de biopelícula de una cepa VTEC y de otra EPEC. Se pudo observar que ambas cepas resultaron formadoras de biopelícula en todos los medios de cultivo ensayados y con ambas metodologías de trabajo. Llama la atención que la cepa VTEC formó más biopelícula

en medio LB cuando este se evaluó a las 72 h —cualquiera haya sido la metodología de trabajo—, pero que frente a una incubación más corta y con la metodología de recambio del medio de cultivo, es decir la metodología B, hubo mayor formación de biopelícula en LBglu. Esto puede vincularse con requerimientos diferentes por parte de cada cepa y el impacto de las distintas metodologías de evaluación. Podría suceder que frente a un mayor tiempo de incubación, los residuos metabólicos generados por la utilización de la glucosa en el medio LBglu y M63 afecten al desarrollo de VTEC de una manera distinta del de EPEC. A diferencia de otros informes que describen EPEC como buena formadora de biopelícula en medios mínimos con glucosa⁴, la cepa EPEC evaluada en este trabajo fue una fuerte formadora de biopelícula en un medio nutritivo suplementado con glucosa con ambas metodologías de trabajo y ambos tiempos de incubación.

Se ha estudiado la producción de biopelícula de *E. coli* y otras enterobacterias en distintos medios, como caldo tripticasa soya (TSB), peptona bacto (BP) y medios mínimos (MSM) suplementados con distintas fuentes de carbono (glucosa, manosa, glicerol, ácido láctico, entre otras). Se ha indicado que en medios mínimos suplementados con glucosa, las bacterias desarrollaron mejor las biopelícula, con una matriz extracelular más gruesa⁶. En nuestro estudio, sin embargo, se observó mayor formación de biopelícula cuando se empleó un medio nutritivo con glucosa. Esto concuerda con otras investigaciones que han encontrado que esta incorporación resultó favorecedora para al desarrollo de la biopelícula en *E. coli* O157:H7, posiblemente debido a que este hidrato de carbono serviría como sustrato para la formación de la matriz de exopolisacáridos y, por ende, aumentaría la cuantificación de la biomasa total¹⁴.

Habitualmente, se utilizan distintos tiempos de incubado para los ensayos de formación de biopelícula en condiciones estáticas, que varían desde 24 h hasta 5 días o más. La elección del tiempo de incubación depende de los objetivos propuestos y del microorganismo involucrado¹². Dado que el desarrollo de las biopelículas transcurre en etapas similares a las descritas para el crecimiento de las contrapartes planctónicas, resulta necesario encontrar la etapa de maduración de la biopelícula, que es la que está directamente relacionada con la resistencia a antibióticos o a agentes desinfectantes¹⁵.

Como conclusión, las cepas VTEC y EPEC evaluadas en este estudio fueron capaces de formar biopelícula sobre superficies de uso cotidiano, como el poliestireno, con mayor intensidad en medios de crecimiento nutritivos que en medios mínimos. La metodología B —que implicó el recambio del medio de cultivo en el mismo pocillo— junto con el uso de LB suplementado con glucosa y un tiempo de incubado de 48 h fueron las condiciones más favorables para el desarrollo de biopelículas en ambas cepas. En estudios recientes, la utilización de esta metodología ha brindado resultados reproducibles en la comparación de la formación de biopelícula de 30 cepas VTEC provenientes de bovinos y de casos clínicos de humanos; también ha permitido evaluar la formación de biopelícula frente a distintas condiciones de estrés físico-químico y térmico de cepas VTEC y EPEC aisladas de diversos reservorios (Cáceres, resultados no publicados).

La estandarización de las técnicas para evaluar la formación microbiana de biopelículas demanda tiempo, ya que en este proceso influyen diversas variables. En este estudio se identificaron cuáles son el medio de cultivo y la metodología de trabajo más adecuados para evaluar la producción de biopelícula por parte de 2 cepas patógenas de *E. coli*.

Financiación

FONCYT-PICT 2013/1749 y SECAT-UNCPBA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

Agradecimientos

Los autores agradecen María R. Ortiz, técnica del Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología (UNCPBA, Tandil, Buenos Aires, Argentina) por su asistencia técnica y colaboración en la realización de este trabajo.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.ram.2018.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.007).

Bibliografía

1. Alonso MZ, Lucchesi PMA, Rodríguez EM, Parma AE, Padola NL. Enteropathogenic (EPEC) and shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. *Food Control*. 2012;23:351–5.
2. Bae Y-M, Baek S-Y, Lee S-Y. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *Int J Food Microbiol*. 2012;153:465–73.
3. Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R. Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005;23:20–6.
4. Culler HF, Mota CM, Abe CM, Elias WP, Sircili MP, Franzolin MR. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. *Biomed Res Int*. 2014;845147:1–10.
5. Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. The outer membrane protein. Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol*. 2000;37:424–32.
6. Dewanti R, Wong ACL. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol*. 1995;26:147–64.
7. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:167–93.
8. Etcheverría A, Cáceres M, Padola N. Caracterización genética de cepas *Escherichia coli* verotoxigénica y enteropatogénica y comparación de la formación de biofilm en distintos medios de cultivo. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, XIV Congreso Argentino de Microbiología, 2016, Resumen MA-0220, Rosario, Argentina.
9. Fernández D, Sanz ME, Parma AE, Padola NL. Short communication: Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from newborn, milk-fed, and growing calves in Argentina. *J Dairy Sci*. 2012;95:5340–3.

10. Gómez J, Gómez-Lus ML, Bas P, Ramos C, Cafini F, Maestre JR. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? *Rev Esp Quimioter*. 2013;26:97–102.
11. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol*. 2010;140:360–70.
12. Nesse LL, Sekse C, Berg K, Johannesen KCS, Solheim H, Vestby LK, et al. Potentially pathogenic *Escherichia coli* can form a biofilm under conditions relevant to the food production chain. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:2042–9.
13. Shridhar PB, Siepker C, Noll LW, Shi X, Nagaraja TG, Bai J. Shiga toxin subtypes of non-O157 *Escherichia coli* serogroups isolated from cattle feces. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;121:1–8.
14. Villegas NA, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A, et al. Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Scientific World Journal*. 2013;607258:1–7.
15. Wang J, Stanford K, McAllister TA, Johnson RP, Chen J, Hou H, et al. Biofilm formation, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of 9 serogroups of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis*. 2016;13:316–24.