

Características de patogenicidad en *Escherichia coli* aislada de tracto intestinal

Rosa María Ramírez Santoyo, Cecilia Frago Reyes, Luz Elena Vidales Rodríguez

Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Biológicas,
Av. Preparatoria s/n Col. Agronómica II, Zacatecas, Zac., CP 98066.

ramirezsanoy@uaz.edu.mx

Resumen: Se caracterizaron 30 aislados de *Escherichia coli* obtenidas de biota intestinal de niños sanos, en función de factores de virulencia expresados frecuentemente en *E. coli* uropatógena (UPEC), se determinó su origen filogenético, perfil de plásmidos y resistencia a los antimicrobianos. En el 56% de los aislados se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fragmentos de genes de sistemas de captación de hierro y en el 26% los marcadores del plásmido pUTI86. Los aislados pertenecen principalmente al grupo filogenético A, presentan en su mayoría, plásmidos de gran tamaño y el 26.5% fue resistente a por lo menos cuatro antimicrobianos. Estos resultados muestran que *E. coli* intestinal porta factores de patogenicidad asociados a UPEC y que representa un organismo con potencial de virulencia.

Palabras clave: *E. coli* comensal, *E. coli* uropatógena, Factores de virulencia.

Abstract: Thirty *Escherichia coli* isolates obtained from the intestinal biota of healthy children were characterized, based on virulence factors commonly expressed in uropathogenic *E. coli* (UPEC), their phylogenetic origin, plasmid profile and antimicrobial resistance were determined. The 56% of the isolates the gene fragments of iron uptake systems were amplified by PCR and the markers of plasmid pUTI86 in 26%. The isolates belong mainly to the phylogenetic group A, most harbor large plasmids and 26.5% were resistant to at least four antimicrobial. These results show that intestinal *E. coli* carries various pathogenicity factors associated with UPEC and that it represents an organism with virulence potential.

Keyword: Intestinal *E. coli*, uropathogenic *E. coli*, virulence factors.

1. Introducción

Escherichia coli es parte de la microbiota normal del tracto intestinal humano y como comensal, vive en una asociación mutualista con los hospederos, sin embargo, también es uno de los patógenos humanos y animales más comunes y es responsable de un amplio espectro de enfermedades [1].

Las cepas de *E. coli* se clasifican en tres grupos: *E. coli* comensal, *E. coli* patógena intestinal (IPEC) y *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC), este último incluye a *E. coli* uropatógena (UPEC). La clasificación de acuerdo a la capacidad de la bacteria para ocasionar enfermedad tiene sustento en la presencia o ausencia de atributos de patogenicidad, de manera que la integración y expresión de estos factores puede ser el resultado de la interacción entre el fondo genético bacteriano y nuevos genes adquiridos [2].

Los modelos de la evolución bacteriana proponen que la diversidad patogénica es el resultado de la adquisición de material genético a través de sucesivas transferencias horizontales de genes [3].

La barrera entre el comensalismo y la patogenicidad es el resultado de un complejo equilibrio entre el estado del hospedero y la presencia y expresión de factores de virulencia en la bacteria [4]. Se considera que las cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas difieren en la presencia y ausencia de elementos de

ADN adicionales que contribuyen a los rasgos de virulencia específicos y varios estudios han sugerido que *E. coli* patógena puede derivarse de cepas comensales mediante la adquisición de genes de virulencia cromosómicos o extracromosómicos [3], por lo tanto se sugiere que, *E. coli* entérica comensal puede ser el reservorio natural de cepas patógenas [5].

En la búsqueda de métodos para diferenciar cepas de *E. coli* patógenas de las cepas comensales se han considerado antecedentes filogenéticos, para lo cual se utiliza una técnica basada en una PCR triple, en función de la combinación de tres marcadores específico: los genes *chuA*, *yjaA* y *TspE.4C2*, los cuales tienen una relación dicotómica que permite distinguir cuatro grupos filogenéticos [6].

Se ha establecido que aislados ExPEC, incluyendo los causantes de infecciones urinarias y sepsis, derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporción del grupo D; el grupo B2 además se caracteriza por poseer un gran número de determinantes de virulencia que promueven eventos como la adherencia, evasión a los mecanismos de defensa del hospedero, adquisición de hierro e invasión celular, por su parte IPEC y *E. coli* comensal derivan de los grupos A y B1, y poseen un menor número y diferentes determinantes de virulencia [7].

En relación a los factores de virulencia en cepas patógenas de *E. coli* en específico UPEC, expresa gran diversidad, entre los que destacan, los sistemas de adquisición de hierro incluyendo a

los sideróforos, los cuales son pequeñas moléculas secretadas, con alta afinidad por iones férricos y con capacidad de competir por éste elemento de fuentes del hospedero. Cada sideróforo tiene un receptor específico para dotar del hierro capturado a la bacteria y adicionalmente la bacteria tiene ATPasas de membrana que transportan este elemento a partir del espacio periplásmico, como es el caso de SitABCD [8]. *E. coli* cuenta con el sistema Feo, para el transporte de hierro ferroso en condiciones anaerobias, éste es importante en la virulencia en *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* y *Campylobacter jejuni* [9].

Respecto a los plásmidos, en diversas bacterias algunos de estos elementos genéticos se han asociado con la patogenicidad, y con la resistencia a los antimicrobianos. En enterobacterias patógenas como *Salmonella*, *Yersinia* y *E. coli* los plásmidos de virulencia son generalmente de gran tamaño [10].

En particular, el plásmido pUTI89 de arquetipo conjugativo, se ha reportado con alta prevalencia en aislados clínicos de UPEC, se reconoce que participa en etapas tempranas de la infección del tracto urinario y en la replicación bacteriana intracelular, característica de virulencia de esta bacteria [11].

Por su lado, la emergencia y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos es un problema actual de salud pública, la vigilancia de la resistencia es una herramienta valiosa para definir estrategias terapéuticas.

El objetivo de este trabajo fue conocer la presencia de genes que codifican factores de virulencia en *E. coli* intestinal los cuales característicamente son expresados en *Escherichia coli* causante de infecciones de tracto urinario y definir el potencial patogénico de *E. coli* intestinal.

2. Material y Método

2.1 Aislamiento bacteriano e identificación bioquímica

Se obtuvieron 30 muestras de heces fecales a partir de niños menores de dos años clínicamente sanos, en el Centro Educativo de Cuidado Infantil de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Las muestras se transportaron al laboratorio en medio Stuart y se sembraron en agar MacConkey por la técnica de aislamiento en cultivo puro, luego se aislaron colonias presuntivas de *E. coli* considerando la morfología colonial, posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas para su identificación, adicionalmente se hizo la tinción de Gram y se observó la morfología bacteriana.

2.2 Identificación de grupos filogenéticos

Para la clasificación filogenética se obtuvo ADN cromosómico de acuerdo a la metodología previamente descrita [12], luego de cuantificar la concentración de ADN y se observó su integridad, se realizó la técnica basada en PCR descrita por Clermont [6], utilizando oligonucleótidos específicos, y la categorización se fundamentó según la combinación de los genes *chuA*, *yjaA* y de *TspE4C2*.

2.3 Genes de sistemas de secuestro de hierro

Se detectaron como factores de virulencia asociados a la captación de hierro los genes *sitA*, *iroN* y *feoB*, para lo cual un fragmento de cada uno de estos fue amplificado por PCR bajo las siguientes condiciones: 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 59°C a 1 min y 72°C a 2 min con una extensión final de 72°C a 10 min. Los oligonucleótidos utilizados fueron los previamente reportados [13].

2.4 Detección del plásmido pUTI89

La presencia de pUTI89 fue determinada por PCR amplificando fragmentos de dos genes localizadas en este plásmido: *ycfA* y UP100, las reacciones se sometieron a una desnaturalización inicial a 95°C durante 12 min. Esto seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30 seg, alineamiento 63°C, 30 seg y extensión 68°C por 3 min y una extensión final a 72°C por 10 min. [14]. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1%, luego se tiñeron con bromuro de etidio, y se fotografiaron mediante el uso de un equipo para análisis y documentación de geles (ChemiDoc XRS con software Image Lab).

2.5 Detección de plásmidos por Electroforesis de campos pulsados (PFGE)

El ADN de plásmidos fue obtenido por la técnica de lisis alcalina y estas muestras se sometieron a PFGE utilizando un equipo CHEF II (BIO RAD). El gel se preparó con agarosa de bajo punto de fusión al 1%, como buffer de corrimiento se usó TBE 0.5 % y las condiciones de corrimiento fueron 6:0 V, 120°, con un factor de aumento lineal, un tiempo de inicio SW de 30s y tiempo final de 60s, por un tiempo total de 16 h. Como marcador de peso molecular se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* con un rango de 240-2200 kb (BIO-RAD). Al término del corrimiento el gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 min y visualizado en analizador de imágenes ChemiDoc XRS y analizados con el software Image Lab para calcular el tamaño de las bandas de acuerdo a su migración.

2.6 Resistencia a los antimicrobianos

Se detectó mediante difusión en agar Müller-Hinton siguiendo la metodología propuesta por el National Committee for Clinical Laboratory Standards [15], utilizando sensidiscos BIO-RAD con los siguientes antimicrobianos: ampicilina, gentamicina, cefepima, tetraciclina, cefalotina, ceftriaxona, trimetoprima/sulfametoxazol, levofloxacina, nitrofurantoína, cloranfenicol, cefotaxima, akamicina, netilmicina y ácido nalidixico.

3. Resultados

3.1 Aislados bacterianos

Posterior a la identificación bioquímica, los aislados *E. coli* de biota normal, fueron registrados en el cepario del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, de la Universidad Autónoma de Zacatecas, asignándoles la clave CEF seguido de un número progresivo.

3.2 Grupos filogenéticos en los aislados CEF y genes de captación de hierro

La clasificación filogenética de los aislados CEF fue: Grupo A el 43.3%, grupo B1 el 6.6%, grupo B2 el 26.6% y un 23.3% para el grupo D. Por su parte, para los genes de los sistemas de captación de hierro cabe destacar que en el 56% de los aislados se amplificaron los fragmentos correspondientes a los tres genes: *iroN*, *sitA* y *feoB*, el resto de los aislados mostró amplificación para uno o dos de estos genes y el aislado CEF1 no amplificó ninguno de los fragmentos (Tabla 1).

Considerando la frecuencia de cada uno de estos genes se tiene que para *iroN* fue del 76.6%, para *sitA* y *feoB*, 73.3% respectivamente.

3.3 Perfil de plásmidos

Mediante PGFE se logró separar bandas correspondientes a plásmidos de gran tamaño en 17 aislados CEF, observando que el número de bandas fue entre 2 y 6 para cada uno de ellos y bajo las condiciones de corrimiento, migraron entre 1590 kb y 250 kb (Figura 1).

3.4 El plásmido pUTI86 en *E. coli* intestinal

En el 26.6% de los aislados CEF se amplificaron los fragmentos de los marcadores genéticos *ycfA* y UP100 lo que es indicativo de la presencia del pUTI89 en *E. coli* de biota normal (Tabla 1).

3.5 Multiresistencia de *E. coli* intestinal

El 26.5% de los aislados fueron resistentes a por lo menos cuatro antimicrobianos, destacan los aislados CEF3 y CEF4

Tabla 1. Características de virulencia en *E. coli* comensal

Aislado <i>E. coli</i>	<i>feoB</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>ycfA</i> / UP100	Plásmidos grandes	Grupo filogenético
CEF1	-	-	-	-	4	D
CEF2	+	+	+	-	0	B2
CEF3	+	+	+	-	0	B2
CEF4	+	+	+	-	0	B2
CEF5	-	+	+	-	0	D
CEF6	+	+	+	-	2	A
CEF8	+	-	+	+	0	A
CEF9	+	-	+	-	0	D
CEF10	+	-	+	+	0	D
CEF12	-	-	+	-	-	B1
CEF13	-	-	+	+	6	A
CEF14	-	+	-	-	2	D
CEF15	-	+	-	-	0	A
CEF16	+	+	+	-	0	A
CEF17	+	+	+	-	0	A
CEF18	+	+	+	-	0	A
CEF19	+	+	+	-	7	B2
CEF20	+	+	+	-	6	A
CEF22	+	+	+	-	4	B2
CEF23	-	+	-	+	6	B2
CEF24	+	+	+	+	2	B2
CEF25	+	+	+	-	1	A
CEF26	+	+	+	+	3	D
CEF27	+	-	+	-	5	B2
CEF28	+	+	+	+	0	A
CEF29	+	+	+	-	0	B1
CEF31	+	-	-	+	2	D
CE 32	+	+	+	+	2	A
CEF33	-	+	+	-	1	A
CEF35	+	+	+	-	2	A

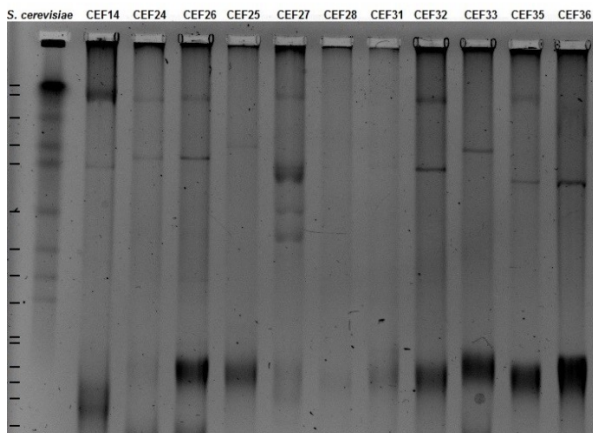


Fig.1. Plásmidos detectados por PGFE, en *E. coli* intestinal

que resultaron resistentes a nueve de los trece antibióticos probados mientras que, CEF28 mostró resistencia a siete de ellos. Cabe señalar la alta resistencia a la cefalotina alcanzando un 60%, seguida del 26.6% para akamicina y el 23.3% tanto para la ampicilina, trimetoprima/sulfametoxazol y ácido nalidixico. La menor resistencia de solo 6.6%, fue mostrada para cefotaxima, levofloxacina y nitrofuratoína.

4. Discusión

Existen características filogenéticas y un número indefinido de factores de virulencia que teóricamente permiten diferenciar cepas bacterianas patógenas, de las que forman parte de la biota

normal, bajo este contexto, se analizó la presencia de genes de virulencia asociados con la adquisición de hierro, marcadores del pUTI86, perfil de plásmidos y origen filogenético en *E. coli* intestinal.

Los resultados de este trabajo muestran que el 50% de los aislados correspondieron al grupo B2 y D, los cuales característicamente agrupan a cepas ExPEC, el resto de los aislados pertenecen al grupo A y B, que han sido asociados con cepas patogénicas intestinales y cepas comensales respectivamente. Nuestros resultados difieren con lo reportado por Duriez *et al.*, [16], quienes encontraron que *E. coli* comensal aisladas en Francia, Croacia y Mali pertenecen en un 40% al grupo A, 34% son del B, seguido del 15% para el grupo D. Los resultados aquí reportados indican que, la clasificación de *E. coli* en grupos filogenéticos no permite diferenciar entre cepas patogénicas y comensales.

La alta prevalencia en los aislados CEF para *feoB*, *iroN* y *sitA*, indica la importancia de los sistemas de captación de hierro en *E. coli* intestinal, aun cuando éstos se consideran dentro de los principales factores de virulencia en *E. coli* patogénica [17]. La presencia de redundantes sistemas de captación de hierro en esta bacteria, se atribuye a que estos pudieran funcionar en diferentes microambientes en el hospedero. De acuerdo a nuestros resultados el 56% de los aislados CEF presenta los tres genes de los sistemas de captación de hierro analizados. Estudios de metabolómica han descrito que tanto *E. coli* comensal como UPEC pueden expresar el sistema de enterobactina, sin embargo, indican que la presencia de los sistemas yersiniabactinas y salmoquelinas está restringida a UPEC [18] al respecto, cabe destacar que en el 80% (24/30) de los aislados CEF se amplificó el fragmento de *iroN*, que corresponde al receptor del sideróforo tipo salmoquelina, resultado que se contrapone con lo antes descrito [18].

En este trabajo más de la mitad de los aislados CEF (56%) presentaron entre dos y seis bandas de ADN plasmídico en un amplio rango de tamaño, entre 250 kb y 1 590 kb, aun cuando algunos de estos pueden ser isoformas que los plásmidos presentan de acuerdo a su conformación. Anteriormente se ha reportado la caracterización de plásmidos de gran tamaño en *E. coli* patogénica [10], al respecto nuestros resultados representan un esbozo del perfil de plásmidos de gran tamaño en *E. coli* de biota normal y para tener un conocimiento preciso de éstos, será necesario caracterizarlos y en su caso secuenciarlos para que en conjunto con otros ensayos se pueda definir el papel que tienen en la biología *E. coli* comensal.

Respecto a pUTI89, del cual ha sido muy difícil obtener cepas curadas del mismo debido a su alta estabilidad, encontramos que 26.6% de los aislados CEF amplificaron los fragmentos de los genes marcadores *ycfA* y UP100 lo que presupone la presencia del pUTI89 en los aislados de *E. coli* de biota normal, debido a que este plásmido tiene el arquetipo conjugativo cabe la posibilidad de que los aislados CEF hayan adquirido estos elementos por conjugación, la cual es favorecida en microambientes como el intestino en donde el número de bacterias es del orden de 10^{10} /gr de contenido intestinal. La

presencia de pUTI89 en aislados CEF sugiere su potencial papel patogénico.

Sin duda, el panorama actual de la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos hace importante su determinación, cabe señalar que las bacterias se consideran multiresistentes cuando presenta resistencia *in vitro* a por lo menos cuatro drogas antimicrobianas. Bajo este contexto, el hecho de haber detectado que el 26% de los aislados CEF son multiresistentes podría ser indicativo de las modificaciones en la biota intestinal por presión selectiva mediada por el elevado uso de antibióticos en los niños a partir de los cuales se obtuvieron los aislados bacterianos. La resistencia a ampicilina, gentamicina, akamicina, netilmicina y ácido nalidíxico fueron las más comunes en los aislados multiresistentes, mientras que de manera general se observó una alta resistencia a la cefalotina (60%).

En este estudio se encontró que del 26.6% de los aislados CEF multiresistentes, cuatro pertenecen al grupo A, tres al grupo B2 y uno al D, al respecto se ha reportado que el grado de resistencia a los antimicrobianos también varía según el grupo filogenético de *E. coli*, así los grupos considerados más virulentos son más sensibles a las quinolonas en comparación con *E. coli* comensal [19], aquí se mostró que la resistencia al ácido nalidíxico fue principalmente en aislados del grupo B2 que, de acuerdo a lo establecido anteriormente aglutinan a ExPEC. También se ha señalado, que las enterobacterias presentan alta resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina [20], lo cual coincide con los hallazgos de este trabajo. Por lo que es importante monitorear la resistencia a los antibióticos para vigilar los cambios en los patrones de susceptibilidad a estas drogas.

Los resultados aquí reportados indican que los aislados de *E. coli* intestinal obtenidos de niños sanos, presentan factores de patogenicidad que previamente han sido reportados en *E. coli* uropatógena causante de infecciones de tracto urinario, bacteria que se caracteriza por poseer múltiples factores de virulencia, como adhesinas, sistemas de captación de hierro, toxinas, cubiertas de polisacáridos, formación de biopelículas y resistencia a la respuesta inmune. Ochman *et al.*, [3] señalan que *E. coli* patogénica puede derivarse de cepas comensales mediante la adquisición de genes de virulencia, en este mismo sentido, nuestros hallazgos sugieren que en el intestino coexisten cepas comensales y cepas con potencial uropatógeno, las cuales bajo ciertas condiciones reguladas por el microambiente en el hospedero, pueden ocasionar daño. Por lo anterior es de suma importancia considerar medidas de higiene que eviten la contaminación de áreas periuretrales y de la uretra, con cepas de *E. coli* intestinal.

5. Conclusiones

Bajo la premisa de que la patogenicidad bacteriana es multifactorial y multigenética, los resultados de este trabajo sugieren que un alto porcentaje de los aislados de *E. coli* de biota

intestinal son potencialmente patógenos debido a que portan características de virulencia asociados a *Escherichia coli* uropatógena y es probable que la suma de factores de virulencia defina la frágil línea que delimita a las cepas comensales de las patógenas.

Se reitera la importancia de monitorear la resistencia a los antibióticos para vigilar los cambios en los patrones de susceptibilidad a estas drogas en los diferentes aislados bacterianos.

6. Agradecimientos

Al Centro Educativo de Cuidado Infantil de la Universidad Autónoma de Zacatecas, por las facilidades otorgadas para obtener los aislados bacterianos.

Referencias

- [1] Gill, R., Pop, M., Deboy, T., Eckburg, B., *et al.*, *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*, Science, 2006, Vol 312, pp. 1355-1359
- [2] López, D., Carrillo, E., Leyva, M., Orozco, G., *et al.*, *Identification of virulence factors genes in Escherichia coli isolates from women with urinary tract infection in Mexico*, Disponible en <http://dx.doi.org/10.1155/2014/959206> [Consultado en 2019].
- [3] Ochman, H., Lawrence, J., Groisman, E., *Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation*, Nature, 2000, Vol 6784, pp. 299-304
- [4] Picard, B., García, S., Gouriou, S., Duriez, P., *et al.*, *The link between phylogenetic and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection*, Infection and Immunity, 1999, Vol 67, pp. 546-553
- [5] Falkow S. *The evolution of pathogenicity in Escherichia coli, Shigella, and Salmonella*, Microbiology, 1996, No. 2 Vol 5, pp. 2723-2769
- [6] Clermont, O., Bonacorsi S., Bingen, E., *Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group*, Applied and Environmental Microbiology, 2000, No. 10, Vol 66, pp. 4555-4558
- [7] Toval, F., Köhler, C., Vogel, U., Wagenlehner, F., *et al.*, *Characterization of Escherichia coli Isolates from Hospital Inpatients or Outpatients with Urinary Tract Infection*, Journal of Clinical Microbiology, 2014, No. 2, Vol 52, pp. 407-418
- [8] Mokady, D., Gophna, U., Ron, Z., *Virulence factors of septicemic Escherichia coli strains*, International Journal of Medical Microbiology, 2005, Vol 295, pp. 455-462
- [9] Lau, Ch., Krewulak, K., Vogel, H., *Bacterial ferrous iron: The Feo system*, FEMS Microbiology Reviews, 2015, No 2, Vol 40, pp. 273-298
- [10] Johnson, J., y Nolan L., *Pathogenomics of the virulence plasmids of Escherichia coli*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009, No. 4, Vol 73, pp. 750-74
- [11] Song, N., Xu, J., Li, Z., Hernalsteens, J., *Curing a large endogenous plasmid by single substitution of a partitioning gene*, Plasmid, 2015, Vol 82, pp. 10-16
- [12] Sambrook J and Rusell D., “DNA extraction” in Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Ed Cold Spring Harbor. Third edition. USA, 2012, pp. 305-308
- [13] Santamaría Tovar J, “Patrones de virulencia en aislados clínicos de *Escherichia coli* uropatógena”. Tesis de Licenciatura. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas, Enero 2020, pp. 15-20
- [14] Cusumano, C., Hung, C., Chen, S., Hultgren, S., *Virulence Plasmid Harbored by Uropathogenic Escherichia coli Functions in Acute Stages of Pathogenesis*, Infection and Immunity, 2010, No. 4, Vol 78, pp. 1457-1467
- [15] National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacterial that grow aerobically, Approved Standard M7-A5. 2000. NCCLS, Wayne PA
- [16] Duriez, P., Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., Chaventré A., Elion J., Picard B., Denamur E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. Microbiology, 147: 1671-1676
- [17] Jeong, W., Kim, E., Kim, H., Kwon, J., *Pathotyping avian pathogenic Escherichia coli strains in Korea*, Journal Veterinary Science, 2012, Vol 13, pp. 145-152
- [18] Henderson, J., Crowley, J., Pinkner, J., Walker, J., *et al.*, *Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic Escherichia coli*, Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000305> [Consultado en 2019].
- [19] Moreno, E., Prats, G., Planells, I., Planes, M., *et al.*, *Caracterización de Escherichia coli de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal*, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2006, Vol 24, pp. 483-489
- [20] Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, L., Ochoa, T., *Mecanismos moleculares de resistencia a antibiótica en Escherichia coli asociada a diarrea*, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 2011, No. 4, Vol 28, pp. 648-656.