

Caracterización bioquímica y filogrupos de *Escherichia coli* aislados de heces de terneros con diarrea en la Región Cajamarca, Perú

Biochemical characterization and Phylogroups of *Escherichia coli* isolated from feces of calves with diarrhea in the Cajamarca Region, Peru

Marco Cabrera-González^{1*} , Sámy Káterin Chávez-Díaz¹ , Rodolfo Gustavo Gamarra-Ramírez² , Héctor Vladimir Vásquez³ ,
Carlos Quilcate-Pairazamán³  y Medali Cueva-Rodríguez¹ 

¹Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Dirección de Desarrollo Tecnológico Agrario, Estación Experimental Baños del Inca. Baños del Inca, Cajamarca, Perú. ²Universidad Nacional de Cajamarca, Facultad de Ciencias Veterinarias, Laboratorio de Microbiología Veterinaria. Cajamarca, Cajamarca, Perú, ³Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Dirección de Desarrollo Tecnológico Agrario. La Molina, Lima, Perú.

*Correo electrónico: mcabrera9@gmail.com

RESUMEN

Esta investigación tuvo por objetivo la caracterización bioquímica y la identificación de filogrupos en cepas de *Escherichia coli*, de heces de terneros con diarrea, mediante el método de Clermont. Se recogieron treinta y dos muestras de ocho rebaños del caserío Tartar Grande, distrito Baños del Inca, región Cajamarca, Perú. Mediante el crecimiento en agar MacConkey-MUG fueron seleccionadas trece muestras caracterizándose bioquímicamente mediante kit EnteroPluri®-Test e identificadas molecularmente mediante amplificación del gen *uidA* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); se tipificó el filogrupo por PCR cuádruplex de Clermont. Las cepas locales aisladas mostraron un perfil bioquímico fermentadoras de sorbitol y glucosa permitiendo agruparlas e identificarlas en cinco grupos (códigos 71340; 71350; 51340; 61740 y 61340); además se amplificó el gen *uidA* que codifica la enzima beta-glucuronidasa propias del linaje de *E. coli*. La identificación del grupo filogenético permitió observar que están agrupadas en el grupo B1 (69,23 %), F (15,38 %), además los grupos A (7,69 %) y D o E (7,69 %) se distribuyen proporcionalmente en todas las muestras analizadas, se logró mediante amplificación de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*. Las cepas locales aisladas de heces de terneros con diarrea representan poblaciones bacterianas naturalizadas y adaptadas al nicho ecológico de Cajamarca, teniendo la ganadería regional como principal fuente de alimentación las pasturas, posiblemente la contaminación de estas se traduce en un importante medio de transmisión en terneros para la presentación de colibacilosis, ya que estas cepas albergan la mayor proporción de genes de virulencia.

Palabras clave: *Escherichia coli*; Clermont; caracterización; filogrupos

ABSTRACT

The objective of this research was the biochemical characterization and the identification of phylogroups in *Escherichia coli* strains, from feces of calves with diarrhea, using the Clermont method. Thirty-two samples were collected from eight herds from the Tartar Grande Hamlet, Baños del Inca District, Cajamarca Region, Peru. Through growth on MacConkey-MUG agar, thirteen samples were selected, characterized biochemically using the EnteroPluri®-Test kit and molecularly, the strains were identified by amplification of the *uidA* gene using the polymerase chain reaction (PCR) technique; the phylogroup was typified by Clermont quadruplex PCR. The isolated local strains showed a sorbitol and glucose fermenting biochemical profile, allowing them to be grouped and identified into five groups (codes 71340; 71350; 51340; 61740 and 61340); In addition, the *uidA* gene that encodes the beta-glucuronidase enzyme typical of the *E. coli* lineage was amplified. The identification of the phylogenetic group allowed to observe that they are grouped in group B1 (69.23 %), F (15.38 %), in addition to groups A (7.69 %) and D or E (7.69 %) respectively. It was achieved by amplification of the *arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* genes. The local strains isolated from feces of calves with diarrhea represent naturalized bacterial populations adapted to the ecological niche of Cajamarca, having regional livestock as the main source of food for pastures, possibly contamination of these translates into an important means of transmission in calves for the presentation of colibacillosis, since these strains harbor the highest proportion of virulence genes.

Key words: *Escherichia coli*; Clermont; biochemical characterization; phylogroups

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una especie bacteriana versátil por su alta morbilidad, así como la variedad en síndromes y cuadros clínicos asociados a las infecciones por este patógeno; se encuentra presente en el tracto digestivo de muchos vertebrados, incluido el hombre [11], en la mayoría de los animales se considera como habitante normal de los intestinos [41], incluyendo los humanos, como sucede con las cepas patógenas que causan diversas infecciones intra y extra intestinales. A pesar del extenso flujo de genes entre las cepas, la especie *E. coli* tiene una estructura de población globalmente clonal, que consiste en distintos grupos filogenéticos [2, 11]. En Cajamarca, Perú, de 314 muestras de agua potable, se identificaron coliformes termotolerantes (CT) en 55,4 % y entre las muestras positivas para CT, *E. coli* se aisló en 37,3 %; *Klebsiella* spp. en 8,0 %; *Enterobacter* spp. en 5,1 % y *Citrobacter* spp. en 2,5 %. De estos aislados de *E. coli*, un 48,7 % mostró resistencia a los antibióticos [29]; reconociéndose la resistencia que presentan las bacterias frente a los diversos antibióticos como un grave problema para la salud pública a escala global [37].

La diarrea de terneros (*Bos taurus*) asociada con patógenos infecciosos es un problema importante para los productores de lácteos de todo el mundo [17, 18, 28]. Así la mortalidad y los costos de tratamiento son causas importantes de pérdidas económicas para la industria láctea [14]. Las *E. coli* genéricas son una población abundante de bacterias entéricas comensales en animales y humanos y son ubicuas en el medio ambiente [13, 48]. Debido a la gran importancia que se da a esta bacteria en la medicina, se determina y clasifica la *E. coli* en cepas patógenas y no patógenas, encontrándose a disposición diferentes métodos, entre los que cabe indicar: perfil bioquímico, pato tipificación, serotipificación, análisis filogenético [20]. Así mismo, es posible identificarlas mediante electroforesis de enzimas multilocus, tipificación multilocus de secuencias, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la utilización de un termociclador PCRmax, AC 196, Reino Unido y sus respectivas variantes [10, 20, 36]. También la *E. coli* patógena causa millones de casos de disentería, mientras que *E. coli* no patógena se considera como parte normal de la flora intestinal en los mamíferos y en las aves [49].

Según el análisis filogenético se reporta que, *E. coli* está compuesta por cuatro grupos filogenéticos, siendo los principales, A, B1, B2 y D y que las cepas extra intestinales virulentas pertenecen principalmente a los grupos B2 y D [12]. La determinación estructural de *E. coli* con respecto a su fuente de aislamiento fueron los filogrupos B2 o D cepas causantes de infección intestinal [25, 39]. Posteriormente mediante PCR se determinó la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y un fragmento de ADN *TspE4.C2*, además se caracterizó un gen putativo de lipasa esterasa [20]; por lo que basado en la presencia o ausencia de estos 3 genes se podría clasificar los filogrupos en A, B1, B2 y D [12].

Estudios de tipificación multilocus de secuencias - MLST y del genoma de *E. coli* posibilitaron la mejora en su comprensión y de la subestructura, así se reconoce la existencia del filogrupo E pequeño conjunto que no habían sido asignadas y donde la cepa O157:H7 es el más representativo [42]. En la actualidad se reconoce al filogrupo F las cuales son cepas hermanas del filogrupo B2 [11, 42]. Estudios recientes han permitido proponer al filogrupo C el cual se relacionaba al filogrupo B1 del cual difiere [11, 34].

Otros investigadores como Luo y col. [33] informaron sobre linajes nuevos de cepas de *E. coli* genéticamente distintas, pero fenotípicamente indistinguibles [47], por lo que al menos uno de estos linajes de *E. coli* clado I basado en el grado de recombinación

entre este clado y *E. coli* [33]. Motivo por lo cual se reconocen ocho grupos: siete como A, B1, B2, C, D, E, F que pertenecen a *E. coli* sensu stricto, mientras que el octavo es *Escherichia cryptic* clade I. El método de Clermont establece principalmente la vinculación entre el grupo filogenético y la virulencia mediante la determinación de los genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* y *arpA* [6, 48]. Finalmente, el objetivo del presente estudio fue la caracterización bioquímica e identificación de grupos filogenéticos de cepas locales de *E. coli* aisladas, de heces de terneros con diarrea, mediante el método de Clermont.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y cepas bacterianas

Entre enero y marzo de 2019 se recolectó un total de 32 muestras fecales diarreicas en terneros de hasta 1 mes post nacimiento, de raza Holstein, en 08 fundos ganaderos ubicados en el caserío de Tartar Grande: El Triunfo (7°9'10.08" S, 78°28'18.81" O); La Merced (7°8'13.22" S, 78°28'52.45" O); La Victoria (7°11'32.06" S, 78°27'51.3" O); Rabanal (7°7'33.61" S, 78°26'52.59" O); San Antonio (7°9'12.32" S, 78°28'27.89" O); San Vicente de Paul (7°9'12.15" S, 78°28'24.62" O); Santa Teresa (7°9'21.87" S, 78°28'6.43" O); Tartar UNC (7°9'46" S, 78°28'25.34" O); distrito de Baños del Inca, Región de Cajamarca, Perú (FIG. 1).

El aislamiento se realizó en los laboratorios de Biotecnología en Sanidad Animal de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca y Microbiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca

Las muestras fueron tomadas directamente del recto mediante bolsas de propileno de primer uso. Aproximadamente 1 gramo (g) de heces fue diluido en 10 mililitros (mL) de agua peptonada tamponada al 1 %, incubando luego a 37° C durante 24 horas (h) en estufa (Estufa universal Memmert UN-110/ Schwabach/Alemania).

Caracterización bioquímica

Los ensayos fueron realizados empleando el kit EnteroPluri®-Test fermentación (glucosa, adonitol, lactosa, arabinosa, sorbitol, dulcitol); producción (gas, ácido sulfhídrico (H₂S), indol, producción de acetoina /Voges-Proskauer); descarboxilación (lisina, ornitina); desaminación (fenilalanina); hidrólisis de urea; utilización de citrato para identificar entero bacterias y otras bacterias Gram (-).

Posteriormente, una alícuota con 4 microlitros (µL) de la muestra sembrada en caldo peptonado fue sembrada por estrías en placa con Agar MacConkey MUG (Liofilchem-REF.610170), incubándose (Mempert/ICO-50/Schwabach/Alemania) en condiciones aeróbicas a 35°C durante 24 h, identificando las colonias rosadas que fluorescen azul-verde bajo luz ultra violeta (UV) en el rango de 366 nanómetros (nm). Una o dos colonias de cada muestra fueron seleccionadas con características Gram (-) y oxidasa (-) para ser utilizadas en los ensayos bioquímicos para su identificación como colonias de *E. coli* mediante el kit EnteroPluri®-Test-Liofilchem (certificado de calidad N° 78618-78619). Posteriormente según instrucciones del protocolo del fabricante se realizó la interpretación de reacción (TABLA I)

Posteriormente se asignaron código según reacción bioquímica, los que se dividen en 5 grupos que contienen 3 test y cada test se indica con un valor de positividad de 4; 2; 1, según corresponda: Valor 4: cebadores test positivo de cada grupo (Glucosa, Ornitina, Adonitol, Sorbitol, Fenilalanina); Valor 2: segundo test positivo de cada grupo (Gas H₂S, Lactosa, Voges-Proskauer, Urea); Valor 1: tercer test positivo de



FIGURA 1. Distribución geográfica de los 08 fundos muestreados. Caserío Tartar-Grande, Baños de Inca, Cajamarca, Perú, 2019

cada grupo (Lisina, Indol, Arabinosa, Dulcitol, Citrato); Valor 0: cada test negativo. Sumando a cada grupo los números de la reacción positiva se obtuvo un código de 5 cifras que utilizó el manual de códigos del test EnteroPluri-Test lo que permitió identificar al microorganismo.

Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)

Dos o tres colonias de *E. coli* seleccionadas se cultivaron en medio líquido 2xYT (Sigma, REF. Y2377) a 37°C. por 18 h y se evaluó utilizando un espectrofotómetro PCR MAX Lambda 64272, Bibby Scientific Ltd,

Reino Unido, mediante concentración y densidad óptica predispuesta en el espectrofotómetro se determinaron las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) a 600 nm, para contabilizar el crecimiento de bacterias viables en el medio líquido. La extracción de la plantilla de ADN de *E. coli* fue realizada mediante kit de purificación Wizard® Genomic DNA (Promega, REF. A1120), según instrucciones del fabricante, el ADN obtenido fue almacenado en refrigeración utilizando una refrigeradora Samsung, RT35K5930S8/PE, Samsung, México de 4°C, el cual fue utilizado como plantilla para los diversos ensayos de PCR.

TABLA I
Reacción bioquímica mediante kit EnteroPluri®-Test

Sectores	Reacción Bioquímica	Reacción (+)	Reacción (-)
Glucosa / Gas	Fermentación de la glucosa y producción de gas en anaerobiosis	Amarillo	Rojo
	Producción de gases	Cera suelta	Cera adherida
Lisina	Descarboxilación de la lisina en anaerobiosis	Violeta	Amarillo
Ornitina	Descarboxilación de la ornitina en anaerobiosis	Violeta	Amarillo
H ₂ S / Indol	Producción de hidrógeno saturado	Negro-marrón	Beige
	Producción de indol	Rosa-rojo	Incoloro
Adonitol	Fermentación del adonitol	Amarillo	Rojo
Lactosa	Fermentación de la lactosa	Amarillo	Rojo
Arabinosa	Fermentación de la arabinosa	Amarillo	Rojo
Sorbitol	Fermentación del sorbitol	Amarillo	Rojo
Voges-Proskauer	Producción de acetoina	Rojo	Incoloro
Dulcitol / Fenilalanina	Fermentación del dulcitol	Amarillo	Verde
	Deaminación de la fenilalanina	Marrón Oscuro	Verde
Urea	Hidrólisis de la urea	Púrpura	Beige
Citrato	Utilización del citrate	Azul	Verde

Análisis para identificación y determinación /filogrupo

La identificación molecular de *E. coli* procedentes de terneros con diarrea se determinó mediante PCR empleando “cebadores” (F 5'-TCAGCGCGAAGTCTTTATACC-3'; R 5'-CGTCGGTAATCACCATTC-3'), para amplificación del gen *uidA* (248pb), [25, 27]. El perfil térmico de la reacción de PCR fue: desnaturalización inicial 94°C—2 minutos (m), 25 ciclos (desnaturalización 94°C—30 segundos (s); hibridación 55°C—30 s; extensión 72°C—45 s) y extensión final 72°C—2 m.

Los fragmentos de ADN amplificado para identificar la cepa de *E. coli* y filogrupo se separaron por su tamaño mediante electroforesis —agarosa 1 %. El análisis de los fragmentos se realizó a través de tinción del gel con Sybr Green (Thermo Fisher) y su observación fue realizada en transiluminador UV 302 nm Labnet U1001 Taiwan [50].

Para determinar filogrupo A, B1, B2, C, D, E o F en *E. coli* de las muestras diarreicas, se usó un PCR—cuádruplex, basado en la amplificación de genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* y *arpA* [9] (TABLA II).

La amplificación se realizó en un volumen de 20 µL, conteniendo 4 µL de tampón 5X (suministrado con *Taq* polimerasa), dNTPs 0,6 µL (2,5 microMol [µM]), *Taq* Polimerasa 0,2 unidades (U), 2,8 µL de ADN aproximadamente 100 nanogramos (ng)·mL⁻¹. Los cebadores que se utilizaron fueron *chuA*-FR (1µL·10 µM⁻¹), *yjaA*-FR (1µL·10 µM⁻¹), *TspE4.C2*-FR (1µL·10 µM⁻¹) y *arpA* (1µL·10 µM⁻¹).

El perfil térmico de la reacción de amplificación empleado fue: desnaturalización inicial 94°C—4 m, 30 ciclos (desnaturalización 94°C —5 s, hibridación 57°C—20 s, extensión 59°C—20 s) y extensión final 72°C—5 m.

Análisis estadístico

Se realizó mediante el software SPSS para Windows (V. 24.0; IBM. Corp., Armonk, Nueva York, Estados Unidos). Se utilizó el método de clasificación jerárquica para las variables evaluadas (pruebas bioquímicas: glucosa, gas, lisina, ornitina, H₂S, indol, adonitol, lactosa, arabinosa, sorbitol, Voges-Proskauer, dulcitol, fenilalanina, urea, citrato), la agrupación de clústeres se realizó mediante Criterio de varianza mínima de Ward.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas

Del total de muestras recogidas de campo y sembradas en agar MacConkey MUG se seleccionaron 13 muestras, como cultivos positivos de *E. coli*.

Caracterización bioquímica

Se pudo determinar que las cepas aisladas de *E. coli* provenientes de muestras de terneros con diarrea (TABLA III) las que fueron agrupadas de acuerdo a positividad (+) o negatividad (-) de la reacción bioquímica en cinco grupos con código : **71340** + (glucosa, gas, lisina, indol, lactosa, arabinosa, sorbitol); - (ornitina, H₂S, adonitol, Voges-Proskauer, dulcitol, fenilalanina, urea, citrato). **71350** + (glucosa, gas, lisina, indol, lactosa, arabinosa, sorbitol, dulcitol); - (ornitina, H₂S, adonitol, Voges-Proskauer, fenilalanina, urea, citrato). **51340** + (glucosa, lisina, indol, lactosa, arabinosa, sorbitol); - (gas, ornitina, H₂S, adonitol, Voges-Proskauer, dulcitol, fenilalanina, urea, citrato). **61740** + (glucosa, gas, indol, adonitol, lactosa, arabinosa, sorbitol); - (lisina, ornitina, H₂S, Voges-Proskauer, dulcitol, fenilalanina, urea, citrato). **61340** + (glucosa, gas, indol, lactosa, arabinosa, sorbitol); - (lisina, ornitina, H₂S, adonitol, Voges-Proskauer, dulcitol, fenilalanina, urea, citrato), presentando reacción negativa en todas las cepas aisladas para la reacción bioquímica de fenilalanina, urea y citrato.

Se realizó un dendograma de clasificación según Ward para asignar puntaje elaborado, 4; 2; 1, para los diferentes procesos bioquímicos indicados en el kit EnteroPluri®-Test en la identificación de cepas de *E. coli*, donde se pudo observar en el clúster 1 que las características que presentan las cepas de *E. coli*, es mayor en actividad sobre la glucosa y el sorbitol, luego por preponderancia continua el clúster 2, que son fermentadoras de lactosa, y productoras de gas, y el tercer clúster de baja relevancia se encuentran la mayoría de los componentes como Lisina, Ornitina, H₂S, Indol, Arabinosa, Voges-Proskauer, Dulcitol, Urea, Citrato (FIG. 2).

Identificación molecular y filogrupo de *E. coli*

Para la identificación de cepas locales de *E. coli* presentes en heces de terneros con diarrea, se amplificó el gen *uidA* el cual codifica la enzima β—glucuronidasa. El análisis de los productos de amplificación

TABLA II
Secuencia de cebadores para identificación de filogrupos de *Escherichia coli*

Gen	Objetivo	Secuencia de los cebadores	Producto PCR (pb)	Referencia
<i>chuA.1b</i>	<i>chuA</i>	F5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	288	Clermont y col. (2013)
<i>chuA.2</i>		R5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'		
<i>yjaA.1b</i>	<i>yjaA</i>	F5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3'	211	Clermont y col. (2004)
<i>yjaA.2b</i>		R5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'		
<i>TspE4C2.1b</i>	<i>TspE4.C2</i>	F5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'	152	Clermont y col. (2004)
<i>TspE4C2.2b</i>		R5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'		
<i>ArpAgpE.f</i>	<i>arpA</i>	F5'-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3'	301	Lescat y col. (2012)
<i>ArpAgpE.r</i>		R5'-GAAAAGAAAAGAATCCCAAGAG-3'		

TABLA III
Generación de código de identificación de cepas de *Escherichia coli* según reactividad a pruebas bioquímicas, mediante kit EnteroPluri®-test

Test	Grupo 1		Grupo 2			Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5					
	Glucosa	Gas	Lisina	Ornitina	Ácido sulfhídrico	Indol	Adonitol	Lactosa	Arbnsa	Sorbitol	Producción acetoina (VP)	Dulcitol	Fenilalanina	Urea	Citrato
Código positivo	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Resultados	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Código	7		1			3		5		0					
Identificación 71350 / <i>Escherichia coli</i>															
Código positivo	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Resultados	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Código	7		1			3		5		0					
Identificación 71350 / <i>Escherichia coli</i>															
Código positivo	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Resultados	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Código	5		1			3		4		0					
Identificación 51340 / <i>Escherichia coli</i>															
Código positivo	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Resultados	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Código	6		1			7		4		0					
Identificación 61740 / <i>Escherichia coli</i>															
Código positivo	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Resultados	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Código	6		1			3		4		0					
Identificación 61340 / <i>Escherichia coli</i>															

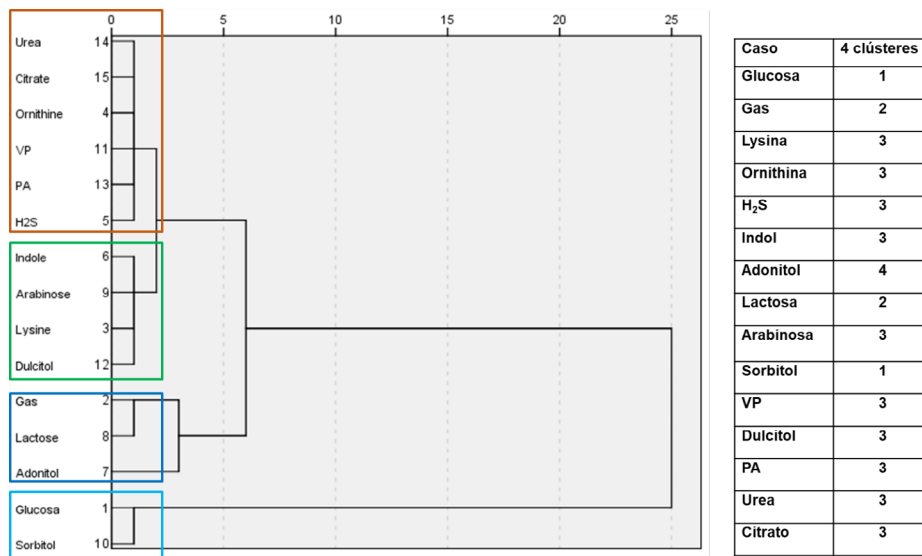


FIGURA 2. Evaluación de la sensibilidad, mediante el métodos de clasificación jerárquica para las variables evaluadas (reacción bioquímica), la agrupación de clústeres se realizó mediante criterio de varianza mínima de Ward, distancia euclidiana cuadrada, utilizando el software Minitab (Versión 19.2020.1; licencia 6MJYXQIJGKZWLEYHARYW)

fue realizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, método simple y eficaz para separar, así también, identificar y purificar fragmentos de ADN entre un peso molecular de 0,5 a 25 kb [46]. Se observaron bandas electroforéticas del tamaño esperado: 248

pares de base (pb) positivas para la región amplificada del gen *uidA*. El mismo fue detectado en el 92,30 % de las muestras analizadas, lo cual evidencia la identificación de *E. coli*, dado que este gen es específico para esta bacteria (FIG. 3).

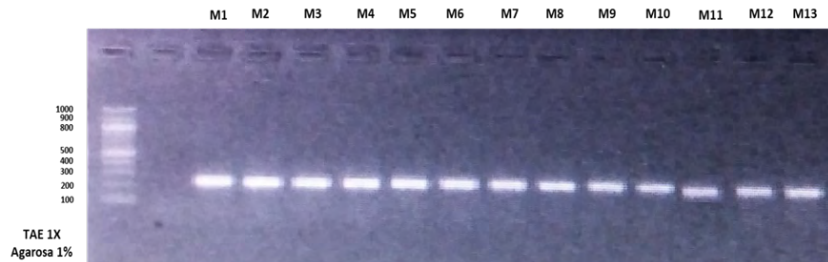


FIGURA 3. Análisis de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa (1%), del gen *uidA*. Carril 1 Marcador de 100 pb. Muestras positivas en todos los carriles

La relación de filogrupo en *E. coli* aisladas se determinó mediante Clermont y col. [9], basándose en productos amplificados por PCR cuádruplex correspondiente a los genes *chuA* (288 pb), *yjaA* (211 pb), fragmento de ADN TspE4.C2 (152 pb), *arpA* (301 pb), la amplificación de los genes se relacionó con la identificación de filogrupos encontrados en las muestras analizadas A, B1, D o E y F. (TABLA II).

Se pudo observar que el porcentaje de filogrupos encontrados en las 13 muestras aisladas de terneros con diarrea están ubicadas en el grupo B1 (69,23%), F (15,38%), mientras que los grupos A (7,69%) y D o E (7,69%), respectivamente. Lo que sugiere que las cepas B1 mantienen poblaciones ligeramente mayores que sus contrapartes y está asociado principalmente a terneros con problemas de diarrea por motivo que este filogrupo es más virulento debido a que estas

cepas son portadoras los genes de virulencia en el ganado vacuno productora de leche [45].

El método de PCR cuádruplex de Clermont se ha observado que es útil en la identificación filogenética de *E. coli* por ser económico, fácil de utilizar y con buen rango de eficacia se basa en la evaluación del gen *yjaA* que codifica una proteína hipotética, en el genoma de *E. coli* K-12; gen *chuA* está ubicado en la membrana externa importante en el transporte de hemo de la cepa O157:H7; una secuencia de ADN TspE4.C2 ubicada dentro de un gen que codifica lipasa esterasa [15] y el gen *arpA* que codifica la proteína de repetición de arquinina [9].

La presencia de genes amplificados en gel de agarosa al 1% para la determinación de los filogrupos se puede observar B1, F, A, D o E. (TABLA IV)

TABLA IV
Patrón de filogrupo determinado en muestras fecales de terneros.
Tartar-Grande, Baños de Inca, Cajamarca, Perú, 2019

Aislado	Gen <i>arpA</i>	Gen <i>chuA</i>	Gen <i>yjaA</i>	Fragmento TspE4.C2	Grupo
a1	+	-	-	+	B1
a2	+	-	-	+	B1
a3	+	-	-	+	B1
a4	+	-	-	+	B1
a5	+	-	-	+	B1
a6	+	-	-	+	B1
a7	+	-	-	+	B1
a8	+	+	-	-	D o E
a9	+	-	-	+	B1
a10	+	-	-	+	B1
a11	+	-	-	-	A
a12	-	+	-	-	F
a13	-	+	-	-	F

B1 (+ - - +), F (- + - -), A (+ - - -), D o E (+ + - -)

E. coli se encuentra en la flora intestinal en animales y humanos [26], pudiendo producir enfermedad, la cual cursa con diarrea frecuentemente en terneros jóvenes principalmente durante los primeros días de vida [1], ocasionando importantes pérdidas económicas para los productores en todo el mundo [8, 17, 48]. Con la finalidad de conocer las características bioquímicas, filogrupos de *E. coli* en muestras diarreicas de terneros en la Región Cajamarca, Perú, se identificaron 13 muestras mediante EnteroPluri®-Test, para la identificación de enterobacterias; habiéndose comprobado que los aislados correspondían a *E. coli*; pudiéndose observar que el 100 % de cepas cultivadas mostraron sorbitol lo cual concuerda con otros resultados reportados por Picard y col. [39, 44], como lo que se menciona, que en estudio realizado en Chile donde 56 muestras de carne de bovino contaminadas con esta bacteria fueron fermentadoras de sorbitol hasta un 98,2 %.

Otros estudios realizados por Orth y col. [38] reportan una infección por *E. coli* de una familia de granjeros de Salzburgo - Austria, de la cual las muestras procedían de 42 animales de la granja siendo todas fermentadoras de sorbitol (identificado por API 20E; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) post incubación en agar MacConkey sorbitol.

Teniendo en cuenta que las muestras obtenidas procedían de terneros con diarrea, al observar la positividad de estas cepas a la prueba bioquímica del D-Sorbitol, el cual es un carbohidrato fermentable, donde la mayoría de las cepas hemorrágicas de *E. coli* no fermentan se puede mencionar que, esto fue reportado por primera vez en Alemania, constituyéndose como un patógeno emergente, capaz de producir enfermedad potencialmente mortal, presentándose en un 10 a 20 % de los casos esporádicos y además provocando brotes más importantes y de mayor magnitud [4]. Por lo que se sugiere que el ganado vacuno puede albergar cepas locales de *E. coli* fermentadoras del sorbitol, teniendo en cuenta que *E. coli* O57:H7 no fermentadora de sorbitol está presente en este reservorio animal [5], la cual es productora de la toxina shiga *E. coli* O157:H7, presente en infecciones entéricas graves, incluyendo colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico [35].

La importancia de la identificación y amplificación del gen *uidA* mediante PCR, se da debido a que es un gen específico del linaje de *E. coli* [21] y es utilizado a menudo en muchas investigaciones por ser específico [22]. Bajo este mismo contexto, la amplificación realizada a la región del gen *uidA* utilizando ADN extraído de los cultivos identificados mediante pruebas bioquímicas, generaron amplicones específicos del tamaño esperado (FIG. 4); coincidiendo con otros estudios publicados que confirman, que mediante amplificación dirigida al gen *uidA* se puede detectar en forma directa *E. coli* [22]. Otras

investigaciones realizadas por Asim y col. [3] muestran amplificaciones del gen *uidA* similares a las encontradas en los resultados mediante PCR basándose en regiones específicas del gen, no observándose amplificación para otras bacterias entéricas y no entéricas [3]. Otros investigadores como Liy y col. [32] mencionan que, el género *Escherichia* comprende muchas especies, entre las cuales se tienen *E. coli*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*, *E. albertii* y *E. marmotae* siendo, todas las cepas utilizadas provenientes del tracto intestinal bovino, de muestras aisladas de terneros relacionados son síntomas de enfermedad diarreica, están dentro de la especie *E. coli*.

En cuanto a la clasificación de filogrupos de *E. coli* a partir de las muestras diarreicas de terneros, se han basado en la utilización del protocolo de trabajo de agrupación publicado por Clermont y col. [9], lo cual permitió observar que estas cepas locales de *E. coli* se encontraban en el filogrupo B1 en mayor proporción y en el filogrupo A en menor proporción, siendo ambos grupos asociados a procesos ambientales, representando a poblaciones bacterianas naturalizadas y adaptadas al nicho ecológico y asociado principalmente a contaminación de las pasturas, lo que se traduce en un importante medio de transmisión en terneros para la presentación de colibacilosis, ya que estas poblaciones bacterianas pueden ser naturalizadas, pudieron haber sobrevivido a las condiciones ambientales de la región de Cajamarca y se adaptaron a las pasturas que sirven como alimentación del ganado [7, 23, 43], ya que es una especie versátil que abarca comensales inofensivos, así también cepas patógenas con la capacidad de causar infección intestinales o extraintestinal en muchos huéspedes como humanos y animales [31].

Los resultados obtenidos en cuanto al filogrupo B1 encontrado se asemejan a otras investigaciones realizadas, donde se menciona que este grupo es el más numeroso hallado en pasturas para ganado en donde se reporta aislamientos del grupo B1 (66 %) en muestras de suelo, (32 %) en heces de bovinos y (40 %) en pasturas [19] y hay que tener en cuenta que los grupos B1 y A pueden constituirse como patógenos intestinales y provocar enfermedad en los terneros [40].

Es así que, con los datos obtenidos se puede considerar que los factores de virulencia se asocian al filogrupo siendo importante esta característica, debido que en la región Cajamarca el filogrupo B1 se presenta en mayor proporción, las cepas portadoras de este grupo tienen mayores genes de virulencia en ganado vacuno lechero [45]. Por otro lado, Tenailon y col. [42] mencionan que, la evidencia en determinar que los diferentes grupos filogenéticos juegan distintos roles ecológicos; como por ejemplo en humanos, se presentan principalmente los filogrupos A (40 %) y B2 (25,5 %) y en menor proporción son menos prevalentes los

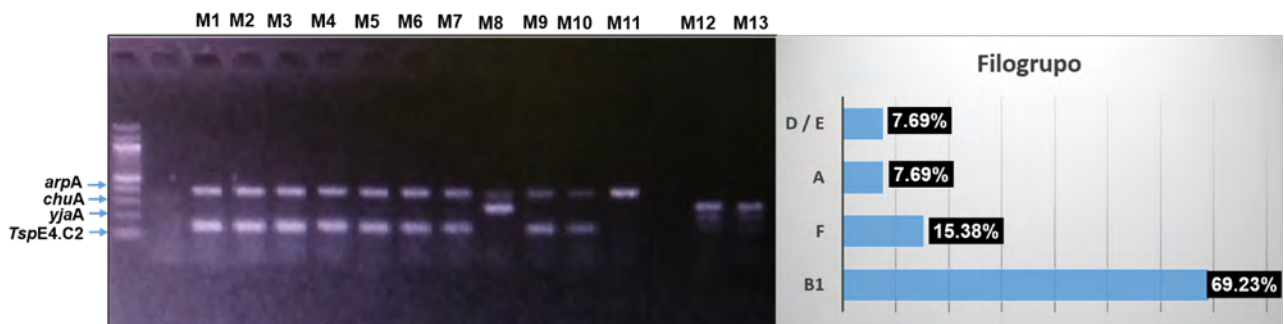


FIGURA 4. A) Perfil PCR cuádruplex, método de tipificación de filogrupo-Clermont en muestras de heces aisladas de *E. coli* de terneros con diarrea observadas mediante electroforesis - agarosa 1 %. Marcador 100 pb; Carriles M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M9 y M10 (grupo B1); M8 (grupo D o E); M11 (grupo A); M12 y M13 (grupo F). B) Porcentaje de distribución de los filogrupos

filogrupos B1 y D (17 %); mientras que en animales los filogrupos más prevalentes son B1 (41 %) siguiendo A (22 %), B2 (21 %) y D (16 %), con lo cual se demuestra que el filogrupo encontrado en terneros en la región de Cajamarca es también el filogrupo B1. Además, se observaron cepas pertenecientes al filogrupo F, las cuales son cepas provenientes de reservorios animales, considerándolas como comensales del intestino de animales, pudiendo causar enfermedades diarreicas extraintestinales severas [30]; es importante tener en cuenta en cuanto al filogrupo F está formado por un grupo hermano relacionado con el filogrupo B2 [11, 24].

Por otra parte, en los resultados del presente estudio se observó la existencia de cepas de los filogrupos pertenecientes a D o E (+ + - -) según la clasificación de Clermont y col. [9], otras investigaciones manifiestan que estos filogrupos están relacionados, así también mencionan que el filogrupo F está relacionado con el grupo filogrupo B2, grupo que se presenta más en humanos [16, 39]. Esto posiblemente se deba al medio ambiente, anatomía del intestino, condiciones medio ambientales del nicho ecológico, que influyen en la estructura filogenética de *E. coli*, aisladas de muestras de terneros con diarrea [42].

CONCLUSIONES

La identificación de cepas bacterianas locales, aisladas de muestras fecales de terneros identificados mediante amplificación del gen *uidA* específico del linaje de *E. coli*, las cuales son principalmente fermentadoras de sorbitol y que presentan un perfil filogenético mayoritariamente del grupo B1, permite concluir que se trata de poblaciones bacterianas naturalizadas y adaptadas al nicho ecológico de la región de Cajamarca, Perú, teniendo la ganadería regional como principal fuente de alimentación las pasturas posiblemente la contaminación de estas se traduce en un importante medio de transmisión en terneros para la presentación de colibacilosis, ya que estas cepas albergan la mayor proporción de genes de virulencia. Además, se requiere realizar más estudios de caracterización de estos aislamientos bacterianos incluidos su adaptación al medio ambiente y grado de patogenicidad.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existe ningún tipo de conflicto de intereses con la publicación de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ACRES, S.D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. **J. Dairy Sci.** 68: 229-256. 1985. <https://doi.org/ftjtkp>.

[2] ALTERI, C. J.; MOBLEY, H. L. T. *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. **Current Opinion in Microbiol.** 15(1): 3. 2012. <https://doi.org/fzmb34>.

[3] ASIM, K.; BEJ, J.L.; DICESARE, J.L.; HAFF, L.; ATLAS, R.M. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in Water by Using the Polymerase Chain Reaction and Gene Probes for *uid*. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1013-1017. 1991.

[4] BAUWENS, A.; MAREJKOVÁ, M.; MIDDENDORF-BAUCHART, B.; PRAGER, R.; KOSSOW, A.; ZHANG, W.; KARCH, H.; MELLMANN, A.; BIELASZEWSKA, M. Sorbitol-Fermenting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- Isolates from Czech Patients with Novel

Plasmid Composition Not Previously Seen in German Isolates **Appl. Environ. Microbiol.** 83(23): e01454-17. 2017. <https://doi.org/hwwb>.

[5] BIELASZEWSKA, M.; SCHMITD, H.; LIESEGANG, A.; PRAGER, R.; RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; CIZEK, A.; JANDA, J.; BLAHOVA, K.; KARCH, H. Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H strains and a source of human diseases. **J. Clin. Microbiol.** 38(9): 3470-3473. 2000.

[6] BINGEN, E.; PICARD, B.; BRAHIMI, N.; MATHY, S.; DESJARDINS, P.; ELION, J.; DENAMUR, E. Phylogenetic Analysis of *Escherichia coli* Strains Causing Neonatal Meningitis Suggests Horizontal Gene Transfer from a Predominant Pool of Highly Virulent B2 Group Strains. **J. Infect. Dis.** 177(3): 642-650. 1998. <https://doi.org/cx5fvw>.

[7] BRENNAN, F.P.; O'FLAHERTY, V.; KRAMERS, G.; GRANT, J.; RICHARDS, K.G. Long-term persistence and leaching of *Escherichia coli* in temperate maritime soils. **Appl. Environ. Microbiol.** 76: 1449-1455. 2010. <https://doi.org/dkjcjms>.

[8] CHO, Y.I.; YOON, K.J. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. **J. Vet. Sci.** 15: 1-17. 2014. <https://doi.org/f5wkwh>.

[9] CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J.K.; DENAMUR, E.; GORDON, D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ. Microbiol.** 5(1): 58-65. 2013. <https://doi.org/f4nr28>.

[10] CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiol.** 161: 980-988. 2015. <https://doi.org/hwww>.

[11] CLERMONT, O.; OLIER, M.; HOEDE, C.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S.; KEROUDEAN, M. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infect. Genet. Evol.** 11(3): 654-662. 2011. <https://doi.org/djjcq8>.

[12] CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(10):4555-4558. 2000. <https://doi.org/ckvvd2>.

[13] CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 26(4): 822-880. 2013. <https://doi.org/f5fqmb>.

[14] DONALDSON, S.C.; STRALEY, B.A.; HEGDE, N.V.; SAWANT, A.A.; DEBROY, C.; JAYARAO, B.M. Molecular Epidemiology of Ceftiofur-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Dairy Calves. **Appl. Environ. Microbiol.** 72(6): 3940-3948. 2006. <https://doi.org/b4c2zm>.

[15] DOUMITH, M.; DAY, M.J.; HOPE, R.; WAIN, J.; WOODFORD, N. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. **J. Clin. Microbiol.** 50(9): 3108-3110. 2012. <https://doi.org/gmtgv2>.

[16] ESCOBAR-PÁRAMO, P.; LE MENACH, A.; LE GALL, T.; AMORIN, C.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; SKURNIK, D.; DENAMUR, E. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environ. Microbiol.** 8: 1975-1984. 2006. <https://doi.org/dbfhsc>.

- [17] FOSTER, D.M.; SMITH, G.W. Pathophysiology of diarrhea in calves. **Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.** 251: 13-36. 2009. <https://doi.org/cpxrvvm>.
- [18] GHARIEB, R; FAWZI, E; ELSOHABY, I. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases Antibigram, virulotyping and genetic diversity of *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars isolated from diarrheic calves and calf handlers. **Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.** 67: 101367. 2019. <https://doi.org/gmxmjg>.
- [19] GITANJALI, N.; TARREN, S.; TOBY, F.; MADHAV, N.; STEPHANUS, N.V.; VOLKER, S.B. Distribution of Diverse *Escherichia coli* between Cattle and Pasture. **Microbes Environ.** 32(3): 226-233. 2017. <https://doi.org/hwwd>.
- [20] GORDON, D. M; CLERMONT, O; TOLLEY, H; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: Multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environ. Microbiol.** 10(10): 2484-2496. 2008. <https://doi.org/bw2zcr>.
- [21] HYMA, K.E; LACHER, D.W; NELSON, A.M; ALYSSA, C.; BUMBAUGH, J.; JANDA, M.; STROCBINE, N.A.; YOUNG, V.B.; WHITTAM, T.S. Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. **J. Bacteriol.** 187: 619-628. 2005. <https://doi.org/d437s3>.
- [22] IQBAL, S.; ROBINSON, J.; DEERE, D.; SAUNDERS, J.R.; EDWARDS, C.; PORTER, J. Efficiency of the polymerase chain reaction amplification of the uid gene for detection of *Escherichia coli* in contaminated water. **Lett. Appl. Microbiol.** 24: 498-502. 1997. <https://doi.org/bwvk65>.
- [23] ISHII, S.; KSOLL, W.B.; HICKS, R.E.; SADOWSKY, M.J. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from lake Superior watersheds. **Appl. Environ. Microbiol.** 72:612-621. 2006. <https://doi.org/btp7n2>.
- [24] JAUREGUY, F.; LANDRAUD, L.; PASSET, V.; DIANCOURT, L.; FRAPY, E.; GUIGON, G.; CARBONELLE, E.; LORTHOLARY, O.; CLERMONT, O.; DENAMUR, E.; PICARD, B.; NASSIF, X.; BRISSE, S. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. **BMC Genomics.** 9: 560. 2008. <https://doi.org/cx6jr3>.
- [25] JOHNSON, J.R.; STELL, A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.** 181(1): 261-72. 2000. <https://doi.org/dqjh6j>.
- [26] KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.** 2:123-140. 2004. <https://doi.org/bb2pfn>.
- [27] KONNO, T; YATSUYANAGI, J; TAKAHASHI, S; KUMAGAI, Y. Isolation and Identification of *Escherichia albertii* from a Patient in an Outbreak of Gastroenteritis. **Jpn. J. Infect. Dis.** 65: 203-207. 2012. <https://doi.org/f3zvj5>.
- [28] LAINE, T.M; YLIAHO, M; ANTTILA, M. Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. **Acta. Vet. Scand.** 11: 1-11. 2008. <https://doi.org/c42tcr>.
- [29] LARSON, A.; HARTINGER, S.M.; RIVEROS, M.; SALMON-MULANOVICH, G.; HATTENDORF, J.; VERASTEGUI, H.; DANIEL, M. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Drinking Water Samples from Rural Andean Households in Cajamarca, Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 100(6): 1363-1368. 2019. <https://doi.org/gntw49>.
- [30] LE GALL, T.; CLERMONT, O.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; NASSIF, X.; DENAMUR, E.; TENAILLON O. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. **Mol. Biol. Evol.** 24: 2373-2384. 2007. <https://doi.org/bv2rbn>.
- [31] LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 358: 3-32. 2013. <https://doi.org/gj6h87>.
- [32] LIU, S.; JIN, D.; LAN, R.; WANG, Y.; MENG, Q.; DAI, H.; LU, S.; HU, S.; XU, J. *Escherichia marmotae* spp. nov., isolated from faeces of *Marmota himalayana*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 65: 2130-2134. 2015. <https://doi.org/hwwh>.
- [33] LUO, C.; WALK, S.T.; GORDON, D.M.; FELDGARDEN, M.; TIEDJE, J.M.; KONSTANTINIDIS, K.T. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 108(17): 7200-7205. 2011. <https://doi.org/cvvhvmz>.
- [34] MOISSENET, D.; SALAUZE, B.; CLERMONT, O.; BINGEN, E.; ARLET, G.; DENAMUR, E.; MÉRENS, A.; MITÁNCHEZ, D.; VU THIEN, H. Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. **J. Clin. Microbiol.** 48(7): 2459-2463. 2010. <https://doi.org/cg7hsn>.
- [35] NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11(1): 142-201. 1998.
- [36] O'SULLIVAN, J.; BOLTON, D. J.; DUFFY, G.; BAYLIS, C.; TOZZOLI, R.; WATESON, Y.; LOFDAHL, S. Methods for Detection and Molecular Characterization of Pathogenic *Escherichia coli*. 2006. Pathogenic *E. coli* Network. En línea: <https://bit.ly/3t3LL1C>. 25-05-2021.
- [37] OCHOA, T.J.; RUIZ, J.; MOLINA, M.; DEL VALLE, L.J.; VARGAS, M.; GIL, A.I.; LANATA, C.F. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 81(2): 296-301. 2009. <https://bit.ly/3auG32l>.
- [38] ORTH, D.; GRIF, K.; DIERICH, M.P.; WÜRZNER, R. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: indications for an animal reservoir. **Epidemiol. Infect.** 134(4): 719-723. 2006. <https://doi.org/d2dgv5>.
- [39] PICARD, B.; GARCIA, J.S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** 67:546-553. 1999.
- [40] PUPO, G.M.; KARAOLIS, D.K.; LAN, R. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. **Reeves PR. Infect. Immun.** 65(7): 2685-2692. 1997.
- [41] SERRANO, A.; SERRANO, J.J.; AYALA, D.; GUERRA, Y.; PADILLA, J.; TREJOS-SUÁREZ, J. Caracterización por PCR-múltiple del grupo filogenético de *Escherichia coli* uropatógena aisladas de pacientes ambulatorios de Bucaramanga, Santander. **Rev. Fac. Cien Salud UDES.** 3(1): 25. 2016. <https://doi.org/hwwk>.
- [42] TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.** 8: 207-217. 2010. <https://doi.org/fp93mr>.

- [43] TEXIER, S.; PRIGENT-COMBARET, C.; GOURDON, M.H.; POIRIER, M.A.; FAIVRE, P.; DORIOZ, J.M.; POULENARD, J.; JOCTEUR-MONROZIER, L.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; TREVISAN, D. Persistence of culturable *Escherichia coli* fecal contaminants in dairy alpine grassland soils. **J. Environ. Qual.** 37: 2299-2310. 2008. <https://doi.org/bw7m2q>.
- [44] TORO, M.; RIVERA, D.; JIMÉNEZ, M.F.; DÍAZ, L.; NAVARRETE, P.; REYES-JARA, A. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, Chile. **Food Microbiol.** 75: 55-60. 2018. <https://doi.org/hwwm>.
- [45] UNNO, T.; HAN, D.; JANG, J.; LEE, S.N.; KO, G.; CHOI, H.Y.; KIM, J.H.; SADGOWSKY, M.J.; HUR, H.G. Absence of *Escherichia coli* phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam Province, Republic of Korea. **Appl. Environ. Microbiol.** 75(17): 5659-5666. 2009. <https://doi.org/c8ms8v>.
- [46] VOYTAS, D. Agarose gel electrophoresis. **Curr. Protoc. Immunol.** 2:10.4.1-10.4.8. 2001. <https://doi.org/dd6p3z>.
- [47] WALK, S.T.; ALM, E.W.; GORDON, D.M.; RAM, J.L.; TORANZOS, G.A.; TIEDJE, J.M.; WHITTAM, T.S. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. **Appl. Environ. Microbiol.** 75(20): 6534-6544. 2009. <https://doi.org/b9p7h7>.
- [48] WANG, H.H.; MANUZON, M.; LEHMAN, M.; WAN, K.; LUO, H.; WITTUM, T. E.; BAKALETZ, L. O. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. **FEMS. Microbiol. Lett.** 254(2): 226-231. 2005. <https://doi.org/fmkf6d>.
- [49] WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L.H.; ACHTMAN, M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. **Mol. Microbiol.** 60(5): 1136-1151. 2006. <https://doi.org/d5txqk>.
- [50] ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Res.** 32(12): e103. 2004. <https://doi.org/ffxknt>.