

Análisis filogenético de cepas de *Escherichia coli* aisladas de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea en la sierra central del Perú

Phylogenic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from young alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhoea in the central Peruvian Andes

Francisco Sicha R.¹, Siever Morales-Cauti^{1,5}, Juan Lucas L.³, Carlos Eslava C.⁴,
María Vásquez C.², Manuel Barrios A.², José Rodríguez G.³, Boris Lira M.²

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue la determinación de grupos filogenéticos de *Escherichia coli* obtenidos de alpacas con diarrea. Se determinó la presencia de *E. coli* en 150 muestras de heces diarreicas recolectadas de crías de alpaca de la sierra central del Perú, y se determinó la distribución de los grupos filogenéticos mediante el método de Clermont. *E. coli* estuvo presente en el 79.3% (119/150) de los animales con diarrea, pudiendo clasificarse en los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D, los cuales mostraron una frecuencia de 13.5% (16/119), 65.5% (78/119), 1.68% (2/119) y 19.33% (23/119), respectivamente. El 21% (25/119) de cepas aisladas de *E. coli* pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D, principalmente cepas patógenas extraintestinales, y el 79% (94/119) a los grupos B1 y A, que son principalmente cepas comensales.

Palabras clave: alpacas, diarrea, *Escherichia coli*, grupo filogenético, método Clermont

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Laboratorio de Fisiología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Estación Experimental IVITA - El Mantaro, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

⁴ Laboratorio de Bacteriología Intestinal, Hospital Infantil Federico Gómez, México DF, México

⁵ E-mail: sieverm@hotmail.com

Estudio financiado por INNOVATE PERU mediante Proyecto N.º 173-FINCYT-IB-2013

Recibido: 3 de mayo de 2019

Aceptado para publicación: 12 de febrero de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from alpacas with diarrhoea. The presence of *E. coli* was determined in 150 samples of diarrheal faeces collected from young alpacas from the central highlands of Peru, and the distribution of phylogenetic groups was determined by the Clermont method. *E. coli* was present in 79.3% (119/150) of animals with diarrhoea. The strains were classified into phylogenetic groups A, B1, B2 and D, which showed a frequency of 13.5% (16/119), 65.5% (78/119), 1.68% (2/119) and 19.33% (11/23), respectively. Moreover, 21% (25/119) of isolated strains of *E. coli* belonged to phylogenetic groups B2 and D, mainly extraintestinal pathogenic strains, and 79% (94/119) to groups B1 and A, which are mainly commensal strains.

Key words: alpaca, Clermont method, diarrhoea, *Escherichia coli*, phylogenetic group

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli forma parte del microbiota intestinal de la mayoría de las especies animales y del hombre y es uno de los organismos modelo más explorados para la investigación de la evolución y adaptación bacteriana en diferentes condiciones de crecimiento (Kaper *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2007; Alteri y Mobley 2012; Leimbach *et al.*, 2013; Dellepiane y Morales-Cauti, 2018). Este microorganismo puede desarrollarse en diferentes nichos, pudiendo encontrarse en los hospederos vivos, el medio ambiente y los alimentos, por lo que también se le considera un indicador de contaminación fecal y, por ende, de prácticas deficientes de higiene (Lucas *et al.*, 2016b; Corzo-Ariyama *et al.*, 2019). Una de las especies bacterianas más versátiles, ya que además de las cepas comensales, presenta cepas específicas que tienen el potencial de causar numerosas patologías intestinales y extraintestinales (Gordon y Cowling, 2003; Morales *et al.*, 2007; Croxen y Finlay, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010; Alteri y Mobley, 2012).

La gran versatilidad de *E. coli* se explica en su alto potencial de recombinación (Tenaillon *et al.*, 2010), lo que resulta, ade-

más, en una enorme variabilidad genética, por lo que su tipificación juega un papel crítico en el avance de la comprensión de la evolución (Morales *et al.*, 2017), capacidad de causar enfermedad, transmisión y vigilancia de este microorganismo. La tipificación molecular de *E. coli* puede ser realizada mediante metodologías como la electroforesis de enzimas multilocus (*multilocus enzyme electrophoresis*, MLEE), tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus sequence typing*, MLST), por reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*, PCR) y por la secuenciación del genoma (Clermont *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que las cepas de *E. coli* pueden dividirse en cuatro grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D. Esta tipificación, además, se relaciona con el carácter virulento de las cepas de *E. coli*, pues las cepas virulentas extraintestinales (ExPEC) pertenecen principalmente al filogrupo B2 y, en menor medida, al grupo D (Herzer *et al.*, 1990; Clermont *et al.*, 2000, 2015; Wirth *et al.*, 2006; Bok *et al.*, 2020); por otro lado están las cepas que pertenecen a los grupos B1 y A, descritas normalmente como cepas comensales (Bok *et al.*, 2020). Entre los métodos que permiten realizar esta tipificación existe uno que se destaca por su sencillez y

rapidez, denominado «método Clermont» (Clermont *et al.*, 2000), el cual se basa en la detección de tres marcadores genéticos (*chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2) mediante PCR, mostrando una excelente congruencia con métodos de referencia como el MLST en la asignación de filogrupos (Gordon *et al.*, 2008; Clermont *et al.*, 2015).

En la región central de los Andes peruanos, por encima de los 3500 msnm, se desarrolla una crianza de alpacas que resulta crucial en la seguridad alimentaria, ya que estos animales convierten los forrajes silvestres (de limitado potencial nutricional) en recursos de alta calidad como carne y fibra, pero cuyo estado sanitario se ve amenazado por diversos agentes patógenos, entre los que destaca *E. coli*; patógeno que ha sido involucrado con cuadros severos en las crías de estos animales (Morales *et al.*, 2007, 2017; Lucas *et al.*, 2016a; Rodríguez *et al.*, 2017; Dellepiane y Morales-Cauti, 2018). A pesar de ello, no existen reportes sobre la determinación de grupos filogenéticos en camélidos sudamericanos, por lo que el objetivo del presente estudio fue aplicar el método de Clermont para identificar grupos filogenéticos de las cepas aisladas obtenidas de casos de diarrea en crías de alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

La toma de muestras se realizó en las comunidades alpaqueras de Ninacaca, Huayllay y Cochamarca, Pasco, situadas en la sierra central del Perú, por encima de los 3500 msnm. El aislamiento de las cepas se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Estación Experimental IVITA El Mantaro (Junín, Perú) en febrero y marzo de 2014, y la clasificación filogenética se realizó en la Universidad Autónoma de México en agosto de 2014.

Animales y Muestras

Se evaluaron hisopados rectales de 150 crías de alpacas (105 machos y 45 hembras) de 1-4 meses de edad con cuadros diarreicos. Los hisopos fueron conservados en tubos con medios de transporte bacteriano Stuard (Merck, Alemania) a 4 °C hasta su remisión y posterior procesamiento en el laboratorio.

Aislamiento de *E. coli*

El aislamiento de las cepas de *E. coli* se realizó de forma convencional. Las muestras fueron sembradas directamente en agar MacConkey (Merck, Alemania) a 37 °C por 24 horas. Los aislados de colonias presuntivas de *E. coli* fueron identificadas a través de pruebas bioquímicas: indol, motilidad, sulfidril, malonato, urea, citrato de Simmons, lisina y orinitina. Las cepas aisladas de *E. coli* fueron colocadas en agar tripticosa de soya (Merck, Alemania) para su mantenimiento hasta su remisión y ensayos posteriores.

Extracción de ADN

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en caldo Luria Bertani (Merck, USA) a 37 °C por 24 horas. El cultivo (1.5 ml) fue centrifugado a 16 500 g durante 5 minutos, tras lo cual se colocó en baño maría a 100 °C por 10 minutos. Luego fueron introducidas en frío por 5 minutos para ocasionar una lisis celular por shock térmico. Finalmente se centrifugó a 16 500 g por 5 minutos y se conservó el sobrenadante (que contenía el ADN extraído) de cada muestra para su posterior uso.

Análisis Filogenético

Para la tipificación de *E. coli* se utilizó el método de Clermont (Clermont *et al.*, 2000), el cual consiste en la amplificación del ADN mediante un PCR triplex. El volumen final de cada ensayo fue de 20 µl, conteniendo 2 µl de buffer tampón 10x, 20 pmol de

Cuadro 1. Cebadores usados para la detección de grupos filogenéticos de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2000)

Marcador genético	Cebador	Secuencia	Amplicón (pb)
<i>chuA</i>	chuA.1	5'-GACGAACCA ACGGTCAGGAT-3'	279
	chuA.2	5'-TGCCGCCAGTACC AAAGACA-3'	
<i>yjaA</i>	yjaA.1	5'-TGAAGTGTTCAGGAGACGCT G-3'	211
	yjaA.2	5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	
TSPE4.C2	TSPE4.C2.1	5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3'	152
	TSPE4.C2.2	5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	

cada cebador (Cuadro 1), cada uno de los desoxinucleósido trifosfato (dNTPs) al 2 mM, 2.5 U de *Taq* polimerasa (ATGC Biotechnologie, Francia) y 200 ng del ADN extraído en cada muestra, ajustando el volumen final con agua bidestilada estéril. Las condiciones de los PCR fueron las descritas por Clermont *et al.* (2000).

Análisis de Resultados

La clasificación filogenética de *E. coli* se realizó siguiendo el esquema dicotómico realizado por Clermont *et al.* (2000) con relación a la amplificación de los genes estudiados (Cuadro 2). Los resultados fueron expresados como frecuencias de *E. coli* pertenecientes a un grupo filogenético (número de muestras positivas / total muestras evaluadas x 100).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

E. coli estuvo presente en el 79.3% (119/150) de los animales con diarrea, pudiendo clasificarse en los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D, cuyas frecuencias se muestran en el Cuadro 3.

Existen diversos factores que influyen en la prevalencia y densidad de *E. coli*, pero los principales son el medio ambiente y las características del hospedero vivo (tamaño corporal, morfología intestinal, tiempo de retención de la ingesta y la microflora) (Jang *et al.*, 2017). Una prevalencia similar a la determinada en este estudio es la mostrada por Lucas *et al.* (2016a), quienes determinaron que este agente estuvo presente en el 80% de los casos fatales de diarrea en crías de alpacas de la sierra central del Perú.

Las infecciones por *E. coli* en alpacas suelen presentarse como infecciones secundarias, aunque se ha descrito la presencia de algunos patotipos de *E. coli* diarrogénicos involucrados a trastornos gastrointestinales en estos animales (Cid *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2007, 2017; Luna *et al.*, 2012; Silvera *et al.*, 2012). Las *E. coli* diarrogénicas podrían pertenecer a cualquiera de los grupos filogenéticos detectados puesto que la transferencia horizontal de genes de virulencia codificados por plásmidos, incluidas las enterotoxinas y los factores de colonización, podría efectuarse entre cepas de diferentes grupos filogenéticos (Gordon *et al.*, 2008; Rúgeles *et al.*, 2010; Løbersli *et al.*, 2012).

Cuadro 2. Sistema utilizado por Clermont *et al.* (2000) para la agrupación filogenética de *E. coli*

<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4. C2	Grupo filogenético
-	-	-	A
-	+	-	A
-	-	+	B1
-	+	+	B1
+	+	-	B2
+	+	+	B2
+	-	-	D
+	-	+	D

(-): Gen no amplificado; (+): Gen amplificado

Sin embargo, las cepas diarrogénicas, así como las comensales y poco virulentas de *E. coli*, están asociadas a los grupos A y B1 (Clermont *et al.*, 2000, 2015; Wirth *et al.*, 2006).

Por otro lado, las cepas ExPEC pertenecen principalmente al grupo B2 y en menor proporción al grupo D (Bingen *et al.*, 1994; Boyd y Hartl, 1998; Johnson y Stell, 2000; Escobar-Pairamo *et al.*, 2004; Gordon, 2004). La prevalencia de las infecciones urinarias causadas por cepas ExPEC de *E. coli* son cada vez más frecuente en muchos países (Clermont *et al.*, 2013). En el presente estudio se evidencia que las cepas ExPEC podrían estar presentes en el 21% de los aislados de *E. coli*, confirmando a la alpaca como una fuente potencial de estas cepas, y esbozando un posible vínculo con las infecciones extraintestinales de *E. coli* en el poblador andino. Además, diversos reportes en el Perú han descrito el manejo sanitario deficiente que se hace durante el sacrificio (Morales *et al.*, 2007, 2017; Dellepiane y Morales-Cauti, 2018) y expendio (Lucas *et al.*, 2016b) de la carne de otras especies animales, y que también podrían extenderse al comercio de

carne de alpaca, por lo que se debería evaluar la posible transmisión por alimentos de estas cepas.

En el presente estudio también se determinó que el grupo filogenético B1 era el predominante (65.55%), seguido del grupo D, representando los grupos A y B2 menos del 15% de los aislados. No existen reportes sobre la distribución filogenética de *E. coli* en alpacas, pero es muy particular de esta especie por los ambientes extremos en los que se desarrollan y las características de alimentación muy particulares que presenta. En humanos, las cepas del grupo A son predominantes (40.5%), seguido por cepas del grupo B2 (25.5%) (Duriez *et al.*, 2001; Escobar-Pairamo *et al.*, 2004; Nowrouzian *et al.*, 2006). En animales predominan las cepas del grupo B1, con una frecuencia hasta de 48.2%, seguidas por A (hasta 48.2%), B2 (hasta 21%) y D (hasta 16%) (Escobar-Pairamo *et al.*, 2004; Gordon y Cowling, 2003; Skurnik *et al.*, 2006; Baldy-Chudzik *et al.*, 2008; Bok *et al.*, 2020). Estas diferencias pueden deberse a características de la especie en términos de morfología y fisiología intestinal; no obstante, los hábitos alimenticios y el nivel de higiene son los principales factores que explican las distribuciones de los grupos filogenéticos en humanos (Gordon *et al.*, 2005; Skurnik *et al.*, 2008; Tenaillon *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Frecuencia de grupos filogenéticos de *E. coli* aislados de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea

Grupo filogenético	Frecuencia (%)	± IC%
A	13.45 (16/119)	± 6.13
B1	65.55 (78/119)	± 8.54
B2	1.68 (2/119)	± 2.31
D	19.33 (23/119)	± 7.10

CONCLUSIONES

El 21% (25/119) de cepas aisladas de *E. coli* pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D, principalmente cepas patógenas extraintestinales, y el 79% (94/119) a los grupos B1 y A, que son principalmente cepas comensales.

LITERATURA CITADA

1. **Alteri CJ, Mobley HLT. 2012.** *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. *Curr Opin Microbiol* 15: 3-9. doi: 10.1016/j.mib.2011.12.004
2. **Baldy-Chudzik K, Mackiewicz P, Stosik M. 2008.** Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Vet Microbiol* 131:173-184. doi: 10.1016/j.vetmic.-2008.02.019
3. **Bingen EH, Denamur E, Elion J. 1994.** Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev* 7: 311-327. doi: 10.1128/cmr.7.3.311
4. **Bok E, Kozańska A, Mazurek-Popczyk J, Wojciech M, Baldy-Chudzik K. 2020.** Extended phylogeny and extraintestinal virulence potential of commensal *Escherichia coli* from piglets and sows. *Int J Environ Res Public Health* 17: 366. doi: 10.3390/ijerph17010366
5. **Boyd EF, Hartl DL. 1998.** Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J Bacteriol* 180: 1159-1165.
6. **Cid D, Martín-Espada C, Maturrano L, García A, Luna L, Rosadio R. 2012.** Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from neonatal Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea. In: Pérez-Cabal M, Gutiérrez J, Cervantes I, Alcalde M (eds). *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*. The Netherlands: Wageningen Academic Publ. p 223-228.
7. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microb* 66: 4555-4558. doi: 10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000
8. **Clermont O, Christenson J, Denamur E, Gordon D. 2013.** The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 5: 58-65. doi: 10.1111/1758-2229.12019
9. **Clermont O, Gordon D, Denamur E. 2015.** Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology* 161: 980-988. doi: 10.1099/mic.0.000063
10. **Corzo-Ariyama HA, García-Heredia A, Heredia N, García S, León J, Jaykus L, Solís-Soto L. 2019.** Phylogroups, pathotypes, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates in farms and packing facilities of tomato, jalapeño pepper and cantaloupe from Northern Mexico. *Int J Food Microbiol* 290: 96-104. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.006
11. **Croxen MA, Finlay BB. 2010.** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8: 26. doi: 10.1038/nrmicro2265
12. **Dellepiane G.H; Morales-Cauti S. 2018.** Identificación de bacterias patógenas oportunistas en útero de alpaca pre y poscópula. *Rev Inv Vet Perú* 29: 602-610 doi: 10.15381/rivep.v29i2.14478
13. **Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, Picard B, et al. 2001.** Commensal *Escherichia coli* isolates are phyloge-

- netically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 147:1671-1676. doi: 10.1099/00221287-147-6-1671
14. **Escobar-Pairamo P, Clermont O, Blanc-Potard A-Ba, Bui H, Le Bougueñec C, Denamur E. 2004.** A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 21: 1085-1094. doi: 10.1093/molbev/msh118
 15. **Gordon D. 2004.** The Influence of ecological factors on the distribution and the genetic structure of *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 1: 1-13. doi: 10.1128/ecosalplus.6.4.1
 16. **Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. 2008.** Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 10: 2484-2496. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x
 17. **Gordon DM, Cowling A. 2003.** The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 149: 3575-3586. doi: 10.1099/mic.0.26486-0
 18. **Gordon DM, Stern SE, Collignon PJ. 2005.** Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology* 151: 15-23. doi: 10.1099/mic.0.27425-0
 19. **Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. 1990.** Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 6175-6181. doi: 10.1128/jb.172.11.6175-6181.1990
 20. **Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. 2017.** Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications – a review. *J Appl Microbiol* 123): 570-581. doi: 10.1111/jam.13468
 21. **Johnson JR, Stell AL. 2000.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 181: 261-272. doi: 10.1086/315217
 22. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-140. doi: 10.1038/nrmicro818
 23. **Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. 2013.** *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. In: Dobrindt U, Hacker J, Svanborg C (eds). *Between pathogenicity and commensalism*. Berlin: Springer. p 3-32.
 24. **Løbersli I, Haugum K, Lindstedt B-A. 2012.** Rapid and high-resolution genotyping of all *Escherichia coli* serotypes using 10 genomic repeat-containing loci. *J Microbiol Meth* 88: 134-139. doi: 10.1016/j.mimet.2011.11.003
 25. **Lucas L JR, Morales CS, Barrios AM, Rodríguez GJ, Vásquez CM, Lira MB, Torres LB, et al. 2016a.** Patógenos involucrados en casos fatales de diarrea en crías de alpaca de la sierra central del Perú. *Rev Inv Vet Perú* 27: 169-175. doi: 10.15381/rivep.v27i1.11465
 26. **Lucas LJR, Morales-Cauti S, Salazar JEP, Eslava CC, Alvarado DE. 2016b.** Contaminación por *Escherichia coli* Shigatoxigénica en puestos de expendio de carne de pollo en un distrito de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 27: 618-625. doi: 10.15381/rivep.v27i3.12000
 27. **Luna EL, Maturrano HL, Rivera GH, Zanabria HV, Rosadio AR. 2012.** Genotipificación, evaluación toxigénica in vitro y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 280-288. doi: 10.15381/rivep.v23i3.910

28. **Morales CS, Paredes LD, Pezo CD. 2007.** Asociación de rotavirus y *Escherichia coli* fimbriada como agentes causales de infecciones entericas en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 18: 150-153. doi: 10.15381/rivep.v18i2.1486
29. **Morales-Cauti S, Siu CE, Ramírez RP, Navarro OA. 2017.** Determinación de serotipos de *Escherichia coli* aisladas de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con y sin diarrea en Huancavelica. *Redvet* 18(9). [Internet]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/6365300-9034.pdf>
30. **Nowrouzian FL, Adlerberth I, Wold AE. 2006.** Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes Infect* 8: 834-840. doi: 10.1016/j.micinf.-2005.-10.011
31. **Rodríguez GJ, Barrios-Arpi M, Vásquez CM, Lira MB, Morales CS, Lucas LJ, López-Torres B. 2017.** Cambios en la bioquímica sérica en crías de alpaca con diarrea. *Rev Inv Vet Perú* 28: 530-537. doi: 10.15381/rivep.v28i3-.13369
32. **Rúgeles LC, Bai J, Martínez AJ, Vanegas MC, Gómez-Duarte OG. 2010.** Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *Int J Food Microbiol* 138: 282-286. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.-2010.01.034
33. **Silvera CE, Perales CR, Rodríguez BJ, López UT, Gavidia CC, Agapito PJ, Palacios EC. 2012.** Presencia de *Escherichia coli* o157 en crías de alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 23: 98-104. doi: 10.15381/rivep.v23i1.888
34. **Skurnik D, Bonnet D, Bernède-Bauduin C, Michel R, Guette C, Becker JM. et al. 2008.** Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. *Environ Microbiol* 10: 2132-2137. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01636.x
35. **Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, Picard B, Denamur E. 2006.** Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemoth* 57: 1215-1219. doi: 10.1093/jac/dkl122
36. **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010.** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8: 207. doi: 10.1038/nrmicro2298
37. **Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, et al. 2006.** Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60: 1136-1151. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x