

The diversity and spread of genes encoding extended spectrum beta-lactamase enzymes in the strains of *Escherichia coli*

*O. Burduniuc¹, R. Cojocaru¹, S. Gheorghita¹, C. Spinu¹, Iu. Roscin²

¹National Center of Public Health, ²Institute of Microbiology and Biotechnology, the Academy of Sciences
Chisinau, the Republic of Moldova

*Corresponding author: oburduniuc@rambler.ru. Manuscript received August 15, 2013; accepted November 18, 2013

Abstract

The aim of the study is to determine the mechanisms of antibiotic resistance of *Escherichia coli* (*E. coli*), the prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) circulating strains of *E. coli*, establishing genotypes, phylogenetic groups of *E. coli* ESBL in the Republic of Moldova. On the basis of the data of local microbiological monitoring and using the phenotypic and molecular-genetic methods the genetic determinants (beta-lactamase), which cause the formation of resistance to beta-lactamase antibiotics have been identified. By polymerase chain reaction and the sequencing method the prevalence of *E. coli* strains producing ESBL in the urine probes has been identified. Such studies are unique for the Republic of Moldova and can serve as a basis for the establishment of the concept of causal and empirical treatment in our country. Urinary tract infections have been primarily (85%) determined by the *E. coli* species, followed by *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, etc. The enzymes ESBL identified in the strains of *E. coli* in most of the cases have been of CTX-M type, the fact that explains the evolution and dissemination of *E. coli* producing ESBL. *E. coli*, a representative of the intestinal microflora, can serve as a reservoir of antibiotic resistance of microbic germs involved in the etiology of urinary tract infections. The detection of the type of beta-lactamase and the unification of the different subtypes of resistance to microorganisms are possible with the help of molecular biology techniques, by contrast with the phenotypic routine tests, the fact that is shown by the model of *E. coli* producing ESBL.

Key words: antibiotic resistance, beta-lactamase, *Escherichia coli*.

Diversitatea și răspândirea genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins la tulpinile de *Escherichia coli*

Introducere

Antibioticorezistența constituie o problemă multifactorială cu semnificație majoră pentru sănătatea publică, ce necesită o analiză complexă cu implementarea măsurilor specifice, la diferite niveluri [1, 2].

Indicarea unei terapii antibacteriene adecvate în maladiile infecțioase devine dificilă din cauza nivelului ridicat al rezistenței germenilor la antibiotice și diminuării nete a ratei de introducere a antibioticelor noi în practica medicală [3, 4].

Intensificarea relațiilor comerciale și a migrației la nivel

global favorizează răspândirea rezistenței la antibiotice între țări și continente [5].

Producerea de către microorganisme a beta-lactamazelor este una din principalele mecanisme de rezistență la antibioticele beta-lactamice (peniciline, cefalosporine, cefamicine și carbapeneme) la reprezentanții familiei *Enterobacteriaceae* [6, 7].

Studiile similare anterioare au dovedit faptul, că tipul exact de beta-lactamază nu poate fi detectat cu ajutorul testelor de rutină. Asocierea mai multor tipuri de beta-lactamaze la același microorganism face și mai dificilă depistarea corectă [7, 8].

Creșterea vertiginosă a rezistenței tulpinilor de *Enterobacteriaceae* impune necesitatea utilizării tehnicilor rapide și specifice de biologie moleculară. Majoritatea studiilor științifice au fost axate pe implementarea testelor de biologie moleculară care, în unele cazuri, substituie și/sau completează metodele fenotipice tradiționale [9, 10, 11].

Există o varietate de tehnici de biologie moleculară folosite în practica de rutină a laboratoarelor de microbiologie atât pentru detecția directă a patogenilor din probele biologice, confirmarea culturilor cât și pentru detectarea genelor de rezistență la antibiotice la aceste tulpini. Cele mai utilizate dintre aceste metode sunt testele PCR și secvențierea de gene [9].

Rezistența bacteriilor la antibiotice din punct de vedere epidemiologic variază de la o regiune geografică la alta, de la un tip de infecție la alta, de la o perioadă de timp la alta. Majoritatea studiilor demonstrează importanța cercetării nivelului de rezistență și tendinței evolutive a acestei rezistențe într-o anumită arie geografică [12].

Material și metode

Cercetările au fost efectuate pe parcursul anilor 2007-2012, în laboratorul Microbiologia Holerei, BDA și Zooantroponozelor al Centrului Național de Sănătate Publică în colaborare cu CSP teritoriale, laboratorul Spitalului Clinic Municipal nr. 1, Spitalului Clinic Municipal „Sfânta Treime”, Centrul medical „Modus Vivendi, laboratorul microbiologic al spitalului Bichat-Claude Bernard din Paris, Franța.

Metodologia de prelevare a probelor clinice

Urocultura a inclus colectarea probei de urină matinală, la cel puțin 4 ore de la ultima micțiune, înaintea inițierii terapiei antimicrobiene.

Coprocultura: de la fiecare pacient cu infecție a tractului urinar, la care a fost depistat agentul etiologic *E. coli*, s-au recoltat materii fecale pentru identificarea *E. coli* intestinale. Pentru diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului urinar au fost utilizate următoarele metode de examinare aprobate: microscopică, bacteriologică, biologie moleculară (PCR) [13].

Probele de urină au fost însămânțate pe mediile diferențial diagnostice: endo-, geloză sânge, mediul Drigalski, geloză salină cu gălbenuș de ou, enterococ agar, *pseudomonas* agar, saburo. Pentru cercetare au fost selectate doar tulpinile provenite din uroculturi semnificativ pozitive ($\geq 10^5$ UFC/ml). Investigarea fenotipică a tulpinilor *E. coli* a fost efectuată prin teste biochimice, convenționale și microteste (API-20E), teste automatizate cu galerii biochimice (UNMIC/ID-83).

Eta ulterioară a cercetării a inclus testarea sensibilității tulpinilor de *E. coli* la preparatele antimicrobiene, selectate conform recomandărilor Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) și EUCAST, prin utilizarea metodelor fenotipice (disc-difuzimetrică, testul de sinergie – difuzarea bidimensională a 2 discuri cu antibiotice) și de biologie moleculară (reacția de polimerizare în lanț, secvențierea, PCR multiplex, Rep-PCR). Evaluarea rezultatelor a fost efectuată în conformitate cu recomandările ghidului CLSI [14]. Concomitent cu metoda disc-difuzimetrică pentru determinarea concentrației minime inhibitoare a preparatului antimicrobian, care inhibă creșterea microorganismului testat, au fost utilizate galeriile UNMIC/ID-83 ale sistemului automat BD Phoenix.

Controlul intern de calitate s-a efectuat cu tulpina de referință *E. coli* ATCC™ 25922, utilizată pentru testarea sensibilității la antibiotice pe mediile de cultură utilizate. Controlul de calitate pozitiv BLSE a servit tulpinile *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 [8].

Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic, fiind supuse unei analize prin utilizarea metodelor general acceptate. Aprecierea și interpretarea rezultatelor privind rezistența la antibiotice a fost realizată prin intermediul programului WHONet. Datele au fost introduse în baze de date electronice și prelucrate cu ajutorul programelor computerizate, EPI INFO versiunea 6.04.

Rezultate și discuții

Spectrul și ponderea microorganismelor implicate în etiologia ITU. Conform datelor literaturii de specialitate referitoare la structura și frecvența etiologică a infecțiilor urinare, în proporție de 95,0% cazuri sunt determinate de agenții microbieni din familia *Enterobacteriaceae* (dintre ele în 80-95% cazuri *E. coli*, mai rar *Proteus spp.* sau *Klebsiella spp.*), iar în restul cca. 5% – *Pseudomonas aeruginosa*, stafilococi, candidae etc. [9].

Din punct de vedere etiologic, din cele 227 de uroculturi pozitive, *E. coli* a constituit 85%, *Klebsiella pneumoniae* – 3,5%, *Enterococcus faecalis* – 3,1%, *Proteus mirabilis* – 2,6%, *Enterobacter aerogenes* – 2,2%, *Staphylococcus aureus* – 1,8% și *Pseudomonas aeruginosa* – 1,8% (fig. 1).

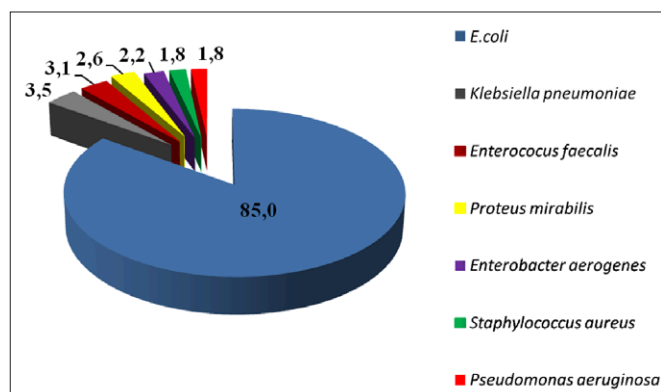


Fig. 1. Spectrul și ponderea (%) agenților microbieni izolați din urocultură.

Rezultatele obținute au relevat faptul că *E. coli* deține locul dominant în etiologia ITU. Rezultatele date au servit drept ar-

gumente în selectarea acestui microorganism pentru studiere și caracterizare în continuare la prezența BLSE.

Identificarea fenotipică a tulpinilor de *E. coli* din urocultura a inclus examenul caracterelor de cultură pe mediile lichide și cele solide. Pe mediul lichid cu bulion nutritiv s-a produs turburarea uniformă a mediului, cu inel la suprafața mediului aderent de pereții tubului. Pe mediul Endo, tulpinile de *E. coli* au crescut în colonii lactozo-pozitive de culoare roșu închis cu luciu metalic. Pe geloză sânge, mediul pentru evidențierea proprietăților hemolizante ale microorganismelor, 1/3 dintre tulpinile studiate au prezentat hemoliză, restul tulpinilor fiind nonhemolitice.

Identificarea în baza caracterelor biochimice a permis încadrarea taxonomică a izolatelor în setul de teste ce includ diferite medii. Tulpinile de *E. coli* au avut caractere tipice de specie: au fermentat glucoza, lactoza și zaharoza, iar pe mediul geloză semilichidă au prezentat mobilitate, nu au hidrolizat ureea și au produs indol. În toate cazurile, testele de utilizare a citratului ca unică sursă de carbon și producerea de H₂S au fost negative. Un număr de 67 (34%) tulpini izolate din uroculturi și de 73 (38%) tulpini din coproculturi au produs o cantitate moderată de gaz pe mediul Kligler. Rezultatele investigării prin 45 de teste biochimice în sistemul automatizat BD Phoenix, obținute peste 8 ore, au elucidat prezența *E. coli*, a câte 193 de tulpini izolate din uro- și coproculturi.

Însămânțarea pe mediul cu geloză suplimentată cu 5% sânge a evidențiat prezența factorului de patogenitate – secreția hemolizinei la 33 (18%) tulpini *E. coli* izolate din uroculturi și la 69 (29%) tulpini *E. coli* izolate din coproculturi. Analiza diversității grupurilor filogenetice prin tehnică PCR triplex s-a bazat pe studierea a 3 gene *chuA*, *yjaA* și fragmentului *chuA*, *yjaA* TspE4.C2, conform algoritmului ilustrat (fig. 2).

În baza rezultatelor analizei filogenetice, realizate prin PCR triplex, tulpinile studiate au fost atribuite la patru gru-

puri filogenetice de *E. coli*, și anume grupurile A, B1, B2 și D. Ponderea grupurilor filogenetice ale tulpinilor urinare a constat 58,5% tulpini de *E. coli* BLSE grupul B2, și respectiv: 27,9% – grupul A, 12,7% – grupul D și 0,9 alte grupuri. Printre tulpinile izolate din coproculturi, grupului filogenetic A i-au fost atribuite 53,4% tulpini și în proporție egală – 23,1% grupurilor B2 și D.

Analizând rezultatele sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *E. coli*, izolate din urocultura realizată prin metoda difuzimetrică, le putem clasifica în următoarele grupuri: tulpini ce prezintă o rezistență înaltă (> 50%) la ticarcilină 57% din tulpini; medie (25-50%) la amoxicilină 47,2% tulpini, cefalotină 41,5% tulpini, tetraciclină 39,4% tulpini, redusă (5-25%) la acid nalidixic 23,8% tulpini, la trimethoprim/sulfamethoxazole 23,3% tulpini, ofloxacină 21,2% tulpini, ciprofloxacina 19,2% tulpini, cefotaxim 12,4% tulpini, kanamicină 11,4% tulpini, cefepim 10,9% tulpini, gentamicină 10,4% tulpini, amoxicilină/acid clavulanic 6,7% tulpini. La unele antibiotice tulpinile de *E. coli* atestă o rezistență joasă (1-5%) la ertapenem 1,7% tulpini; la amikacină 2,1% tulpini; la cefoxitin 3,2% tulpini (fig. 3). Prin urmare, preparatele antimicrobiene față de care microorganismele au manifestat rezistență înaltă și medie, nu vor fi utilizate pentru terapia de primă intenție.

În protocoalele naționale pot fi incluse antibiotice, la care s-a stabilit că *E. coli* manifestă sensibilitate: la amoxicilină/acid clavulanic 79,8%, la ciprofloxacina 80,3%, ceftazidim 85,0%, cefotaxim 85,0%, kanamicină 86,6%, cefepim 88,1%, gentamicină 89,6%, ertapenem 94,2%; amikacină 97,4%, cefoxitin 92,7%.

Preparate față de care microorganismele au manifestat o sensibilitate intermediară, pot fi utilizate cu precauție doar în baza rezultatelor investigațiilor de laborator. Pentru selectarea corectă a dozei de antibiotic se va determina concentrația

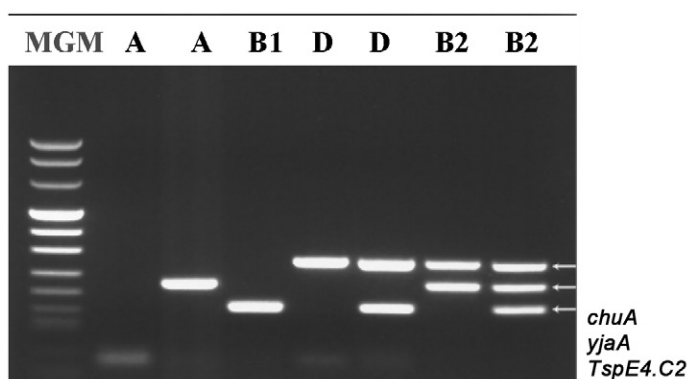
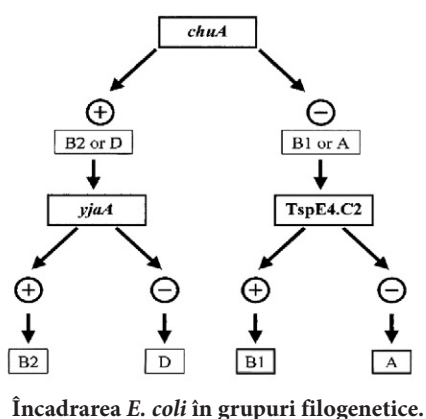


Fig. 2. Încadrarea *E. coli* în grupuri filogenetice după Clermont prin utilizarea tehnicii PCR triplex.

Notă: Fiecare combinație de *chuA* și *yjaA* gene și fragment de amplificare ADN și fragmentului TspE4.C2 a permis determinarea grupului filogenetic al tulpinii de *E. coli* [15].

Notă: Benzile 2 și 3, grupul A; benzile 4, grupul B1; benzile 5 și 6, grupul D, benzile 7 și 8, grupul B2. Benzile 1 – MGM (marker de greutate moleculară).

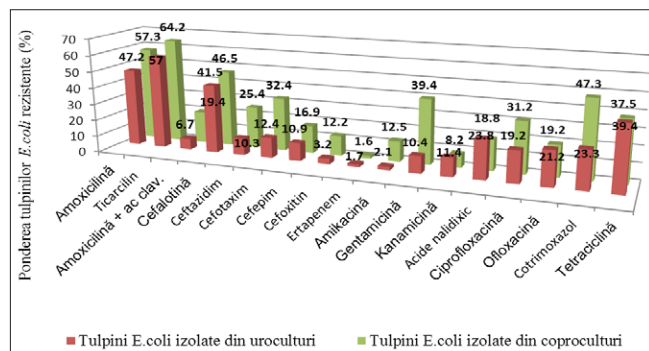


Fig. 3. Profilul rezistenței la antibiotice a tulpinilor de *E. coli* izolate din uro- și coproculturi.

minimă inhibitorie la preparatele antimicrobiene ce vor fi utilizate în tratament.

Analiza rezultatelor antibiogramei tulpinilor *E. coli*, izolate din coprocultură, a demonstrat că aceste tulpini prezintă o rezistență mult mai accentuată la toate grupurile de preparate antimicrobiene, și anume: tulpini ce prezintă o rezistență înaltă (50%) la ticarcilină 64,2% din tulpini; la amoxicilină 57,3% tulpini; medie (25-50%) la cefalotină 46,5% tulpini, la trimetoprim/sulfametoxazole 47,3% tulpini, tetracilină 37,5% tulpini, ciprofloxacina 31,2% tulpini, gentamicină 39,4% tulpini, ceftazidim 25,4 % tulpini; redusă (5-25%) la cefotaxim 32,4% tulpini, la amoxicilină/acid clavulanic 19,4% tulpini, ofloxacină 19,2% tulpini, acid nalidixic 18,8% tulpini, cefepim 16,9% tulpini, amikacină 12,5% tulpini; cefoxitin 12,2% tulpini, kanamycină 8,2% tulpini *E. coli* atestă o rezistență mică (1-5%) numai la ertapenem 1,6% tulpini (fig. 3).

Studierea sensibilității la antibiotice cu utilizarea galeriilor automatizate UNMIC/ID-83 a cuprins cele 25 de antibiotice menționate anterior care au permis constatarea unor rezultate comparabile cu cele obținute prin metoda difuzimetrică. Totodată, tehnica s-a dovedit a fi mai avantajoasă deoarece a permis nu numai selectarea antibioticului sensibil la microorganismul testat dar și determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) a preparatului antimicrobian care inhibă creșterea microorganismului testat.

Tulpinile producătoare de BLSE, detectate prin teste fenotipice, au fost testate prin utilizarea primerilor specifici

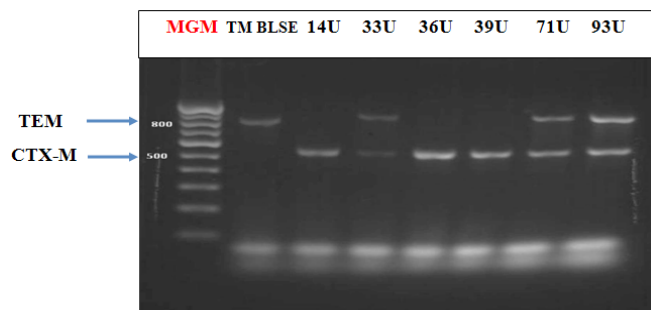


Fig. 4. Electroforeza în gel de agaroză a produselor PCR amplificate.

Notă: banda 1 – marker greutate moleculară; banda 2 (TM BLSE+) – control pozitiv BLSE /SHV (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603); benzile 3-8 - tulpini testate izolate din uroculturi (14U, 33U 36U, 39U, 71U, 93U); banda 3, 5, 6 (14U, 36U, 39U) – CTX-M; banda 4, 7, 8 (33U, 71U, 93U); – CTX-M + TEM.

pentru genele CTX-M și TEM, determinatoare de enzime beta-lactamaze. Screeningul prin PCR al genei bla-CTX-M a constatat faptul că toate tulpinile sunt de tip CTX-M. În urma analizei PCR bla-TEM s-au observat asocieri cu tipul penicilazic producătoare de beta-lactamaze TEM în 57% cazuri. Electroforeza în gel de agaroză a produselor PCR amplificate denotă prezența CTX-M (550bp) și TEM (918bp) gene în tulpinile testate și de control (fig. 4).

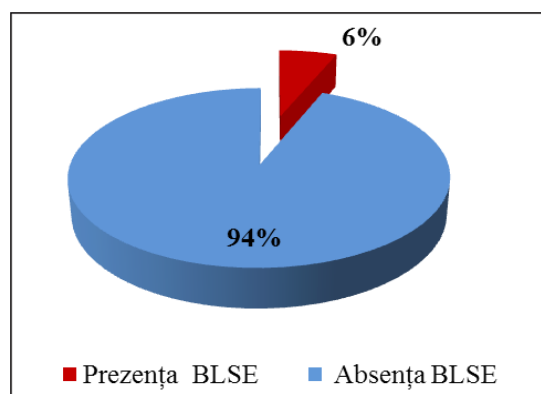
Studierea prin PCR a prezenței genei bla-CTX-M și bla-TEM a evidențiat că toate tulpinile sunt de tip CTX-M. În 46% cazuri s-au identificat tulpinile producătoare de 2 tipuri de beta-lactamaze CTX-M și TEM.

În rezultatul cercetării, prin tehnica PCR, s-a stabilit că prevalența tulpinilor *E. coli* producătoare de BLSE izolate din uroculturi constituie 6%, iar cele izolate din coproculturi – 15%.

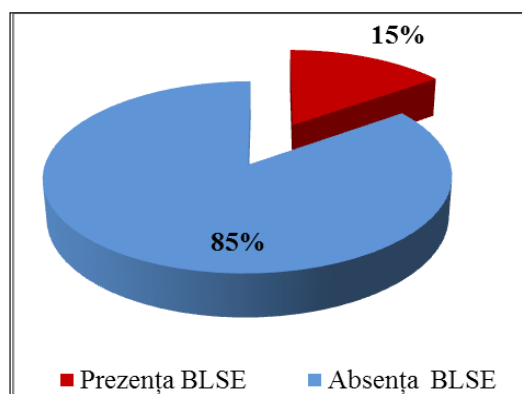
Aceste enzime sunt de 2,5 ori mai frecvent întâlnite la tulpinile izolate din coproculturi, comparativ cu *E. coli* izolate din uroculturi (fig. 5).

Rezultatul secvențierii tulpinilor de *E. coli* relevă prezența următoarelor tipuri de CTX-M: CTX-M-1, CTX-M-3; CTX-M-14, CTX-M-15.

Tipul CTX-M-1 au prezentat 14,4% tulpini, tipul CTX-



Uroculturi



Coproculturi

Fig. 5. Ponderea tulpinilor *E. coli* (%) producătoare de BLSE izolate de la pacienții cu ITU.

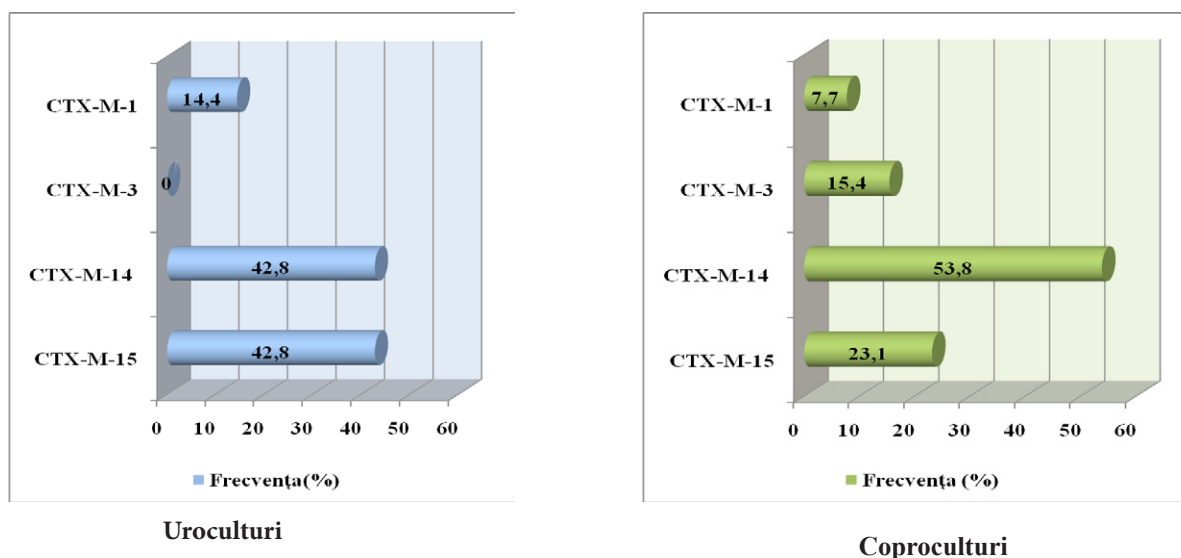


Fig. 6. Diversitatea genotipurilor de *E.coli* BLSE izolate din uroculturi și coproculturi.

M-14 și tipul CTX-M-15 au prezentat a câte 42,8% tulpini BLSE testate. Determinarea diversității genotipurilor de *E. coli* BLSE, izolate din coproculturi, atestă prezența aceluiași tipuri ca și din uroculturi cu diferența prezenței tipului CTX-M-3. Prevalența tipurilor de BLSE este următoarea: 53,8% de tip CTX-M-14; câte 23,1% tipul CTX-M-15; 15,4 % tipul CTX-M-3 și 7,7% tipul CTX-M-1 (fig. 6).

În baza analizei particularităților fenotipice a fost studiată clonalitatea tulpinilor *E. coli* izolate din urocultură și coprocultură. Cercetarea biochimică a tulpinilor izolate din ambele biosubstraturi a stabilit prezența aceluiași biovaruri de *E. coli*. Determinarea factorului de patogenitate a demonstrat prezența hemolizinei atât la tulpinile *E. coli* izolate din uroculturi în 18% cazuri, cât și la tulpini *E. coli* izolate din coproculturi – cazuri.

Clonalitatea tulpinilor de *E. coli* BLSE izolate din uro- și

coproculturi au fost cercetate prin utilizarea tehnicilor de biologie moleculară (metoda Rep – PCR) la nouă tulpini de *E. coli* (fig. 7).

La investigarea *E. coli* BLSE pentru cele 7 din 9 persoane testate, tulpinile *E. coli* BLSE au prezentat profiluri similare. Iar la două persoane tulpinile *E. coli* BLSE 93U/93C și 57U/57C au prezentat profiluri diferite pentru tulpini izolate din uro- și coproculturi (fig. 7).

Concluzii

Infecțiile tractului urinar au fost preponderent (85%) determinate de specia *E. coli*, urmată de speciile de *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* etc.

Frecvența tulpinilor *E. coli* BLSE, izolate din coprocultură, este de 2,5 ori mai înaltă decât la tulpinile de *E. coli* izolate din urină, fapt care manifestă un risc sporit de apariție a clonelor de *E.coli* producătoare de BLSE la tulpinile identificate în coprocultură.

Enzimele BLSE, identificate la tulpinile de *E. coli*, au fost în majoritatea cazurilor de tip CTX-M, circumstanțe ce explică evoluția și răspândirea clonelor de *E. coli* producătoare de BLSE.

Grupurile filogenetice predominante de *E. coli* BLSE, identificate la pacienții cu ITU în teritoriul țării, sunt B2, A și D, fapt ce denotă concordanța rezultatelor studiului cu datele literaturii de specialitate privind prevalența crescută a grupurilor filogenetice de *E. coli* ExPEC (B2 și D).

E. coli, reprezentant al microflorei intestinale, poate servi drept rezervor de rezistență la antibiotice al germenilor microbieni implicați în etiologia infecțiilor tractului urinar.

Detectarea tipului de beta-lactamază și asocierea diferitor subtipuri de rezistență la microorganismele este posibilă cu ajutorul tehnicilor de biologie moleculară, spre deosebire de testele fenotipice de rutină, fenomen demonstrat pe modelul de *E. coli* producătoare de BLSE.

MGM 14U 14C 39C 39U 36C 36U 39C 39U 37C 37U MGM 71C 71U 93C 93U 108C 108U 57S 57U

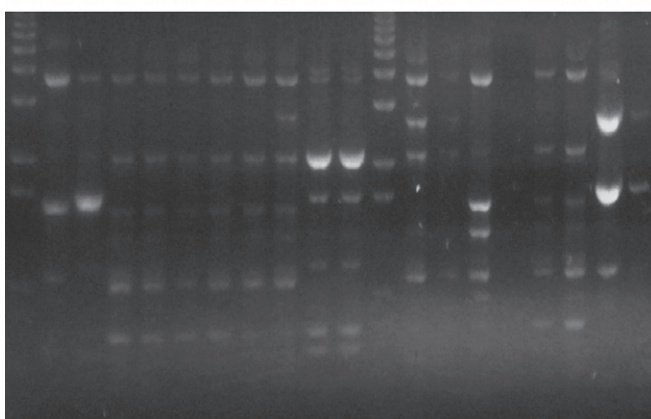


Fig. 7. Clonalitatea tulpinilor *E. coli* BLSE izolate din uroculturi și coproculturi.

Notă: MGM – marker de greutate moleculară; U – profil fragmente produs amplificare ADN *E. coli* din urocultură; C – profil fragmente produs amplificare ADN *E. coli* din coprocultură.

References

1. Wise R. Antimicrobial resistance: priorities for action. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002;49:585-586.
2. Walsh C. Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington: ASM Press, 2003;11-13.
3. Arias C. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010;(16):555-562.
4. Jansen WTM. Bacterial resistance: A sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy. *Europe Drug Resistance Updates.* 2006;9:123-133.
5. European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network (ESAC-Net) <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/esac-net/pages/index.aspx>
6. Chong Y. Genetic evolution and clinical impact in extended - spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Gen Evol.* 2011;11(7):1499-504.
7. Sidorenko S. Beta-laktamazy rasshirenogo spektra: klinicheskoe znachenie i metody detektsii [Beta-lactamase spread spectrum: clinical significance and methods of detection]. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya.* 2002;4(6):1-12.
8. Bernards AT. NVMM Guideline on the laboratory detection of highly resistant microorganisms, version 1.0. 2011.
9. Lopuhov L, Eydelcheyn M. Polimeraznaya tsepnaya reaktsiya v klinicheskoy mikrobiologicheskoy diagnostike [Polymerase chain reaction in the diagnosis of clinical microbiology]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya [Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy]*. 2000;2(3):96-106.
10. Shaginyan I. Rol i mesto molekulyarno-geneticheskikh metodov v epidemiologicheskoy analize vnutribolnichnykh infektsiy [The role and place of molecular genetic methods in the epidemiological analysis of nosocomial infections]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2000;2(3):82-95.
11. Eydelcheyn M. Beta-laktamazy aerobnykh gramotritsatelnykh bakteriy: kharakteristika, osnovnye printsypy klassifikatsii, sovremennyye metody vyyavleniya i tipirovaniya [Beta-lactamases of gram-negative aerobic bacteria: characteristics, the basic principles of classification, modern methods of detection and typing]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2001;3(3):223-242.
12. Zinn C. Sarisa Study Group and typing of hospital *Staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states. *Microb Drug Resist.* 2004;10(2):160-8.
13. Buiuc D, Neagu M. Tratat de microbiologie clinică [The treatise of clinic microbiology]. Ed. II. București: Editura Medicală, 2008;1251.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. 2011;M100-S21.
15. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000;66(10):4555-4558.