



**Identificación de patotipos de *Escherichia coli* en alimentos obtenidos de los
mercados municipales de la ciudad de Quito**

Jácome Hurtado, María Belén

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

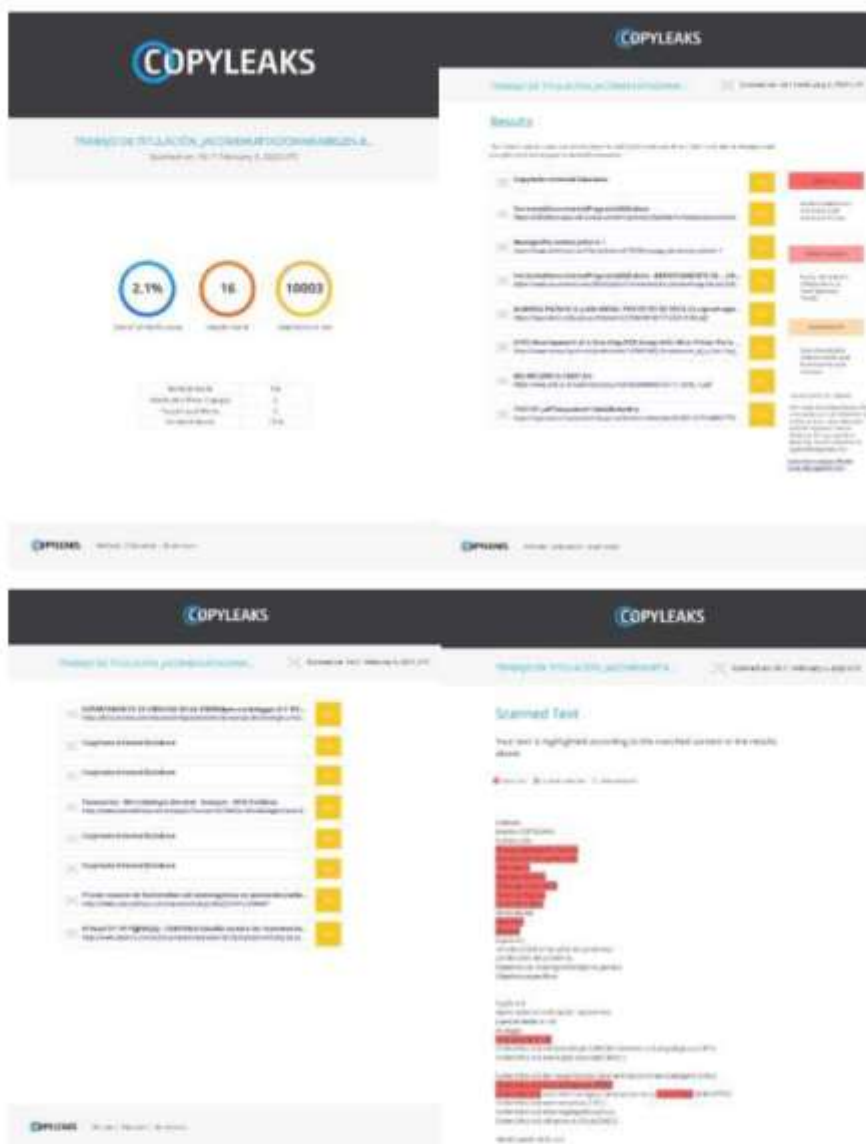
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Reyna Bello, Armando Ph.D.

Marzo 4 del 2022

Reporte de verificación de contenido




Firmado digitalmente por ARMANDO REYNA BELLO
Número de reconocimiento: DNE e-CL-
e-SECURITY SAFETY S.A.S. - ENTIDAD DE CERTIFICACION DE INFORMACION,
serialNumber=29620782238,
cn=ARMANDO REYNA BELLO
+ Factur: 202008-02-18-1204-00-01

Reyna Bello, Armando Ph.D.
Docente investigador ESPE-ES
C. C: 1758891830



DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**Identificación de patotipos *Escherichia coli* en alimentos obtenidos de los mercados municipales de la ciudad de Quito**" fue realizado por la señorita **Jácome Hurtado, María Belén** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, marzo 4 de 2022

 Firmado digitalmente por ARMANDO REYNA BELLO
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC, o=SECURITY DATA S.A. 1, ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE INFORMACION, serialNumber=290620182334, cn=ARMANDO REYNA BELLO
Fecha: 2022.03.02 19:13:50 -05'00'

Reyna Bello, Armando Ph.D.

Docente investigador ESPE-ES

C. C: 1758891830



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Jácome Hurtado, María Belén**, con cédula de ciudadanía , declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Identificación de patotipos de *Escherichia coli* en alimentos obtenidos de los mercados municipales de la ciudad de Quito** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, marzo 4 de 2022

María Belén Jácome

Jácome Hurtado, María Belén

C.C.: 171947871-9



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTUR

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Jácome Hurtado, María Belén**, con cédula de ciudadanía n° 171947871-9, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Identificación de patotipos de *Escherichia coli* en alimentos obtenidos de los mercados municipales de la ciudad de Quito** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, marzo 4 de 2022

María Belén Jácome

Jácome Hurtado, María Belén

C.C.: 171947871-9

Dedicatoria

En memoria de mi compañero de vida y ángel de la guarda Antony Jesús Mera Intriago, con quien inicié este viaje y me impulsó para perder el miedo a seguir mis sueños.

Dedico este trabajo a mi madre, Juana Elizabeth Jácome; mis abuelos, María Elena Hurtado y Rafael Bustillos, a quien considero mi hermana mayor, Diana Bustillos; quienes estuvieron presentes en cada momento de mi vida, me depositaron su total confianza, su apoyo incondicional para cumplir este logro.

A mi tía Carina Davis, por aconsejarme, apoyarme, darme las herramientas para enfocarme en cumplir mis metas sin ninguna otra preocupación y en especial por abrirme las puertas del mundo.

Agradecimientos

Es posible que la terminación de esta tesis no pueda plasmar mi total agradecimiento por todas aquellas personas que estuvieron presentes en cada momento desde que decidí tomar este camino.

Quisiera agradecer en primer lugar a toda mi familia materna, mis tíos abuelos y primos sin su apoyo incondicional nunca hubiera podido llegar hasta este punto de mi vida, nunca me dejaron ni en los peores momentos.

A la familia Bravo por abrirme las puertas de su hogar en Santo Domingo de los Tsáchilas, brindarme alimentación, techo y una familia que guardaré siempre en mi corazón.

A mis amigos Haider Cuello, Emilia Meneses, Esteban Chávez, Karol Curipoma, Solange Bermeo y Boris Torres por hacer de mis días en la Universidad los mejores, por apoyarme y siempre darme consejos cuando lo necesitaba.

A mis maestros Sungey Sánchez, Juan Neira, Armando Reyna y Fabian Villavicencio por darme la oportunidad de poner a prueba mis habilidades, enseñarme lo necesario para ejercer mi profesión de la mejor manera posible.

Un especial agradecimiento al Dr. Camilo Zurita y Jeannete Zurita por darme la oportunidad de ejercer mis prácticas preprofesionales en su prestigiosa institución donde aprendí y estreché lazos de amistad con grandes profesionales que me guiaron en cada momento. Además de financiar el proyecto específico del cual se deriva la presente tesis.

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad De Autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de Figuras.....	12
Índice de Tablas.....	13
Abreviaturas.....	14
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I.....	18
Introducción.....	18
Formulación del problema.....	18
Justificación del problema.....	19
Objetivos de Investigación.....	20
<i>Objetivo general</i>	20
<i>Objetivos específicos</i>	20
Capítulo II.....	21

Marco teórico	21
Clasificación Taxonómica	21
Generalidades <i>E. coli</i>	21
Etiología.....	22
Patotipos de <i>E. coli</i>	23
Escherichia coli extraintestinal (ExPEC)	24
<i>Escherichia coli uropatógena (UPEC)</i>	24
<i>Escherichia coli meningitis neonatal (NMEC)</i>	25
Escherichia coli diarreogénica (DEC)	25
<i>Escherichia coli enteropatógena (EPEC)</i>	25
<i>Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)</i>	26
<i>Escherichia coli enterohemorrágica / productora de la toxina Shiga</i> <i>(EHEC/STEC)</i>	27
<i>Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC)</i>	27
<i>Escherichia coli enteroagregativa (EAEC)</i>	28
<i>Escherichia coli adherencia difusa (DAEC)</i>	28
Identificación de <i>E. coli</i>	29
Antibiograma.....	30
Hipótesis	31
Capítulo III	32
Materiales	32
Metodología	34

	10
Participantes	34
Periodo de investigación	35
Zona de estudio	35
Recolección e identificación muestras previo al estudio.....	36
Conservación de muestras	37
Desarrollo Experimental.....	37
Obtención de cepas control.....	37
Descongelamiento y cultivo de cepas.....	38
Montaje de antibiogramas.....	38
Extracción de ADN de cepas congeladas.....	39
Extracción de ADN de los controles.....	39
PCR Multiplex para identificación de patotipos	39
Análisis estadístico.....	42
Capítulo IV	43
Resultados	43
Diferencia entre la susceptibilidad a los antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> y diarreogénicas	43
Nota: ATM: aztreonam, TE: tetraciclina, SAM: ampicilina-sulbactam. ¡Error! Marcador no definido.	
PCR Multiplex para diferenciación de patotipos.....	46
Identificación de cepas de <i>E. coli</i> en productos alimenticios	46
Aislamientos de DEC presentes en muestras de alimentos	48

Capítulo V	52
Discusión	52
Diferencia entre la susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de <i>E. coli</i> y diarreogénicas	52
Identificación de cepas de <i>E. coli</i> en productos alimenticios	52
Aislamientos de DEC presentes en muestras de alimentos	53
Capítulo VI.....	55
Conclusiones	55
Capítulo VII.....	56
Recomendaciones	56
Capítulo VIII: Bibliografía	57

Índice de Figuras

Figura 1 Sitios de colonización de patotipos de Escherichia coli.....	23
Figura 2 Genes de virulencia característicos de patotipos de E. coli.....	29
Figura 3 E. coli fermentadora de lactosa en Agar MacConkey.....	30
Figura 4 Ubicación geográfica del área de investigación	36
Figura 5 Mapa de calor para visualizar la susceptibilidad de los antibióticos	44
Figura 6 Mapa de calor para visualizar la susceptibilidad a los antibióticos de las E. coli diarreogénicas no BLEE y E. coli diarreogénicas	45
Figura 7 Resultados de la PCR-patotipos de E. coli diarreogénica con ADN de cepas control en gel de agarosa al 2%	46
Figura 8 Gráfico de barras para indicar porcentajes de contaminación por coliformes y E. coli en productos alimenticios.....	48
Figura 9 Resultados PCR de las muestras de alimentos en gel de agarosa al 2% .	49
Figura 10 Gráfico de barras para indicar porcentajes de patotipos de DEC en productos alimenticios contaminados con E. coli.....	50
Figura 11 Gráfico de barras aplicado para comparar los porcentajes de DEC encontrados en productos alimenticios en varios países	51

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	21
Tabla 2 Casos enfermedades transmitidas por alimentos reportados a nivel Nacional	22
Tabla 3 Materiales, equipos y reactivos utilizados en la investigación.....	32
Tabla 4 Controles patotipos de <i>E. coli</i>	37
Tabla 5 Cebadores y criterios para identificación de patotipos de <i>E. coli</i>	40
Tabla 6 Reactivos de mezcla master de PCR multiplex-patotipos de <i>E. coli</i> /Primer ensayo.....	40
Tabla 7 <i>Reactivos de mezcla master de PCR multiplex-patotipos de E. coli/Segundo ensayo.....</i>	41
Tabla 8 Reactivos de mezcla master de PCR multiplex-patotipos de <i>E. coli</i> /Ensayo final	41
Tabla 9 Condiciones de PCR-patotipos de <i>E. coli</i>	42
Tabla 10 Productos alimenticios contaminados con patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénica y susceptibilidad a los antibióticos.	45
Tabla 11 Productos alimenticios contaminados con coliformes, <i>E. coli</i> y patotipos de <i>E. coli</i>	47
Tabla 12 Porcentaje de cepas con amplificación positiva para genes de virulencia correspondiente a patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénica (DEC).....	50

Abreviaturas

AC:adenilciclase

AL: adherencias localizadas

AMK: amikacina

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ATM: aztreonam

BLEE: β-lactamasas de espectro extendido

CIP: ciprofloxacino

DAEC: *E. coli* de adherencia difusa

DEC: *E. coli* diarreogénica

DEPs: patotipos de *E. coli*

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

EPEC: *E. coli* enteropatógena

ERT: ertapenem

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica

ExPEC: *E. coli* extraintestinal

FOS: fosfomicina

FOX: cefoxitina

GA: guanililciclase

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

GE: gentamicina

ITU: Infecciones del tracto urinario

LT: toxinas termolábiles

PCRm: reacción de la cadena de la polimerasa multiplex

SAM: ampicilina/sulbactam

ST: toxinas termoestables

STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga

Stx1: toxina Shiga 1

Stx2: toxina Shiga 2

SXT: trimetoprim-sulfametoxazol

SUH: síndrome urémico hemolítico

TE: tetraciclina

TIGE: tigeciclina

TPZ: piperacilina-tazobactam

TSB: Caldo tríptico de soya, por sus siglas en inglés (Tryptic Soy Broth)

UPEC: *E. coli* uropatógena

Resumen

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo comensal del intestino de seres humanos y animales. Sin embargo, fuera del intestino puede adquirir genes de virulencia que lo convierten en un patógeno de importancia clínica, causando enfermedades extraintestinales e intestinales. Las enfermedades intestinales causadas por *E. coli* diarreogénica (DEC) está relacionada con la ingesta de alimentos contaminados, se divide en cinco patotipos *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productora de toxina Shiga / enterohemorrágica (STEC / EHEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC). En este estudio se analizaron los datos y cepas congeladas de 181 muestras de alimentos de un estudio previo en diferentes mercados de la ciudad de Quito, Ecuador, para identificar coliformes, *Escherichia coli* y patotipos de *E. coli*. En donde se identificaron coliformes, *E. coli* y patotipos de *E. coli* en porcentajes de 51,4%, 27,1% y 3,9% de muestras de alimentos. Las *E. coli* diarreogénicas (DECs) se identificaron en carne de res cruda, legumbres, salsas, entre otros productos cocinados. Los patotipos de DEC identificados en este estudio fueron principalmente en ETEC, EPEC y EHEC. La susceptibilidad a los antibióticos de los patotipos de *E. coli* es relativamente baja, pero si se puede observar en 43% de las cepas resistencia a tetraciclina. El porcentaje de cepas de *E. coli* diarreogénicas (DEC) en productos alimenticios en los mercados municipales de Quito, hallado en la presente investigación coincide con otras investigaciones en Latinoamérica donde la prevalencia de DEC en productos alimenticios no supera el 10% en el total de las muestras recolectadas. Además, los genes de virulencia con mayor frecuencia hallados en los alimentos pertenecen ETEC y EPEC atípicas, que se han encontrado en aislados de heces humanas. Las fuentes de contaminación son variadas durante toda la cadena de procesamiento de los alimentos por lo que se debe mejorar desde la calidad del agua de riego utilizada en los cultivos, las prácticas de manipulación de alimentos e higiene personal, debido a que representa un riesgo en la población de adultos mayores y niños en contraer enfermedades gastrointestinales.

Palabras clave:

- **ESCHERICHIA COLI**
- **PATOTIPOS**
- **PCR**
- **ALIMENTOS**

Abstract

Examination of food samples in the municipal markets of Quito, Ecuador found levels Diarrheogenic *Escherichia coli* (DEC) well exceeding levels found in similar investigations in Latin America. *Escherichia coli* is a communal gram-negative rod found in the intestine of humans and animals. However, outside the intestine, it can acquire virulence genes leading to extraintestinal and intestinal diseases that represent a risk in older adults and children making it a pathogen of clinical importance. Intestinal diseases caused by diarrheogenic *E. coli* (DEC) are related to the ingestion of contaminated food from one of five pathotypes: Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga toxin-producing / enterohemorrhagic *E. coli* (STEC / EHEC), *E. coli* (EPEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), or Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), or Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), or Enteropathogenic *E. coli* (EPEC). In this study, the data and frozen strains of 181 food samples from a previous study in different markets in the city of Quito, Ecuador, were analyzed to identify coliforms, *Escherichia coli*, and *E. coli* pathotypes. Where coliforms, *E. coli* and *E. coli* pathotypes were identified in percentages of 51.4%, 27.1% and 3.9% of food samples. Diarrheogenic *E. coli* (DEC) were identified in raw beef, legumes, and sauces, among other cooked products. The DEC pathotypes identified in this study were mainly ETEC, EPEC, and EHEC. Antibiotic susceptibility of *E. coli* pathotypes is relatively low, but tetracycline resistance can be observed in 43% of strains. The percentage of diarrheogenic *E. coli* strains (DEC) in food products in the municipal markets of Quito, found in the present investigation, coincides with other investigations in Latin America where the prevalence of DEC in food products does not exceed 10% in the total of the collected samples. Furthermore, the most frequently found virulence genes in food belong to atypical ETEC and EPEC, which have been found in isolates from human feces. The sources of contamination are varied throughout the food processing chain, so improvements in the quality of irrigation water used in crops as well as food handling practices and personal hygiene are likely the most effective means of controlling disease spread.

Key words:

ESCHERICHIA COLI

PATHOTYPES

PCR

FOOD

Capítulo I

Introducción

Formulación del problema

La bacteria *Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo que forma parte de la flora intestinal normal de los seres humanos y animales (Mueller & Tainter, 2021). Debido a su capacidad metabólica habita en diferentes nichos ecológicos que incluyen el suelo, agua, alimentos y sedimentos durante largos periodos de tiempo (Leimbach et al., 2013). En el tracto intestinal *E. coli* resulta ser un comensal inofensivo hasta que adquiere elementos genéticos que lo convierten en un patógeno (Croxen & Finlay, 2010) capaz de causar una variedad de enfermedades intestinales y extraintestinales.

Las enfermedades extraintestinales por *E. coli* pueden causar infecciones del tracto urinario (ITU) asociado a *E. coli* uropatógena (UPEC) (Terlizzi et al., 2017), neumonía, septicemia, meningitis y peritonitis, entre otras (Olsvik et al., 1991). En cuanto a las enfermedades intestinales están relacionadas con la ingesta de alimentos contaminados con cepas patógenas (Mueller & Tainter, 2021) denominados *E. coli* diarreogénicas principales causantes de trastornos gastrointestinales alrededor del mundo (Saka et al., 2019) y se clasifican en cinco principales patotipos: enterotoxigénica (ETEC), productora de toxina Shiga / enterohemorrágica (STEC / EHEC), enteropatógena (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) y de esta última se deriva un subtipo adherente difusa (DAEC) (Amézquita-Montes et al., 2015).

En Ecuador, se ha confirmado la presencia de una variedad de microorganismos en alimentos que se venden en calles y mercados de algunas ciudades de Ecuador, entre los cuales se encontró la presencia de coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenesse*

(Salazar-Llorente et al., 2021). Por otra parte, *E. coli* también ha sido relacionada con la propagación de clones epidémicos productores de BLEE en muestras de comida callejera (Zurita et al., 2020) y los patotipos de *E.coli* han sido descritos en investigaciones relacionadas con muestreo de aguas y alimentos en Esmeraldas.

Justificación del problema

En el mundo las enfermedades gastrointestinales leves y crónicas con frecuencia son relacionadas a la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos, uno de los principales agentes etiológicos es *E. coli* diarreogénica y cinco principales patotipos derivados de este. En Ecuador se ha reportado contaminación de los alimentos provenientes tanto de mercados de las principales ciudades (Salazar-Llorente et al., 2021) como de puestos de la calle (Zurita et al., 2020).

Sin embargo, no se han realizado estudios donde, además de identificar por biología molecular distintos coliformes y bacterias, se dediquen específicamente al aislamiento e identificación de patotipos de *E. coli* diarreogénica en las muestras de alimentos recolectados.

Existen varias metodologías aplicadas para la identificación específica de agentes etiológicos gastrointestinales en muestras de heces de pacientes como FilmArray Gastrointestinal Panel (Panel Gastrointestinal) que identifica en una prueba más de 22 patógenos entre ellos *E. coli/Shigella* diarreogénicas: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) *lt/st*, *E. coli* productora de toxinas tipo Shiga (STEC) *stx1/stx2*, *E. coli* O157, *Shigella/enteroinvasiva E. coli* (EIEC) (Binnicker, 2015).

No obstante, para este estudio se probará el protocolo utilizado por Oh et al., 2014, con algunas modificaciones para la estandarización de una PCR multiplex de ocho genes con alta especificidad para la caracterización los principales patotipos ya

mencionados en muestras de ADN obtenidas de cepas de *E. coli* aisladas de los alimentos obtenidos de los mercados municipales de la ciudad de Quito. Del mismo modo, la metodología y la información proporcionada en el presente proyecto busca sentar la base para la identificación y caracterización molecular de los patotipos *E. coli* en futuras investigaciones y realizar una comparación de las cepas circundantes tanto en alimentos como en heces de los pacientes que presentan el cuadro clínico relacionado con enfermedades gastrointestinales.

También, con ello poner en alerta a las autoridades competentes, comerciantes de productos alimenticios y clientes en mejorar los procesos de saneamiento, manipulación de alimentos e higiene del personal durante toda la cadena de elaboración de alimentos hasta que llegue al consumidor final.

Objetivos de Investigación

Objetivo general

Identificar patotipos de *Escherichia coli* obtenidos a partir de los alimentos de los mercados de la ciudad de Quito.

Objetivos específicos

- Cultivar las cepas de *Escherichia coli* en medios específicos para su aislamiento.
- Determinar la resistencia a los antibióticos mediante antibiogramas (difusión por disco) para
- Extraer el ADN de las cepas previamente aisladas por el método de “ebullición”.
- Realizar PCR multiplex para la determinación de los genes de virulencia correspondientes a los patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica que circulan en los alimentos que se expenden en la ciudad de Quito.
- Caracterizar patotipos de *E. coli* presentes en alimentos obtenidos de los mercados de Quito utilizando herramientas de biología molecular.

Capítulo II

Marco teórico

Clasificación Taxonómica

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Escherichia coli

Dominio:	Bacteria
Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma proteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	Escherichia
Especie:	<i>Escherichia coli</i>

Nota: Recuperado de “Sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario en la atención primario de salud Comunidad de Pascuales” (Ordóñez Obando, 2015).

Generalidades *E. coli*

La microflora del tracto gastrointestinal de los seres vivos es diversa, uno de los microorganismos más conocidos es *Escherichia coli*, la cual es una bacteria bacilo gramnegativa (Mueller & Tainter, 2021). El bacteriólogo Theodore Von Escherich, la aisló por primera vez en 1885 de las heces de seres vivos sanos y enfermos, denominándola *Bacterium colicomune* (Ordóñez Obando, 2015). Posee cepas comensales y patógenas, las últimas adquieren diferentes mecanismos y estrategias de virulencia provocando enfermedades de importancia intestinal y extraintestinal (Farfán-García et al., 2016).

Etiología

La *E. coli* como se sabe es una bacteria comensal que forma parte de la flora intestinal, pero también se han encontrado en pisos de hospitales, centros de atención, suelo, alimentos tanto como verduras, carnes crudas o poco cocidas, aguas de riego y residuales. Los alimentos representan un riesgo prevalente para la ciudadanía puesto que tanto en ciudades desarrolladas y poco desarrolladas, las enfermedades gastrointestinales están estrechamente relacionadas con la ingesta de comidas contaminadas que se expenden en restaurantes, mercados y puestos de comida callejeros.

Investigaciones realizadas por Salazar-Llorente et al. (2021) en Ecuador encontraron bacterias patógenas en productos alimenticios provenientes de los mercados de las tres principales ciudades del país, Quito, Guayaquil y Cuenca. Los hallazgos determinaron prevalencia de *E. coli* enterohemorrágica en el 40 al 100% de las muestras de carne molida y queso en las tres ciudades.

Tabla 2

Casos enfermedades transmitidas por alimentos reportados a nivel Nacional

Evento	2017	2018	2019	2020	2021*
Otras intoxicaciones alimentarias bacterianas	11861	15439	12203	5890	2207
Hepatitis A	3499	4126	4314	1057	100
Infecciones debidas a Salmonella	2063	2680	1614	1099	145
Fiebre tifoidea y paratifoidea	1659	1476	1106	766	117
Shigelosis	560	386	248	112	19
Cólera**	1**	0	2**	0	0

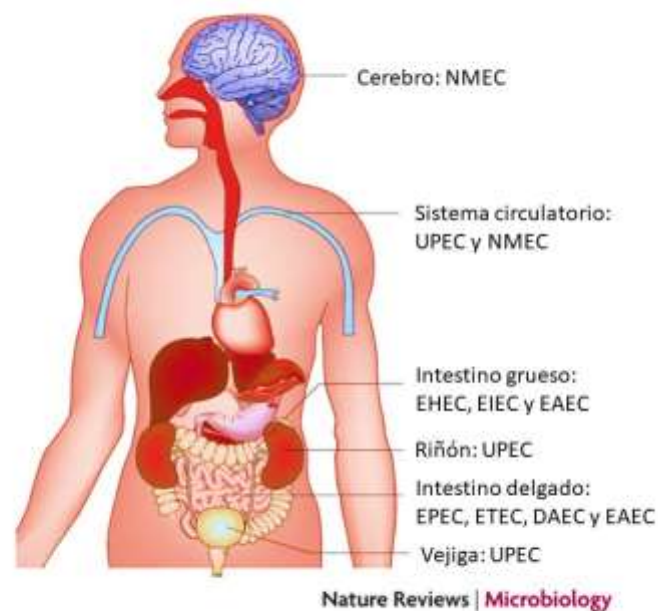
Nota: **Cepa no toxigénica. Fuente: Ministerio de Salud Pública (2021)

Patotipos de *E. coli*

Las cepas patogénicas se dividen en ocho patovares que se clasifican en dos grandes grupos *E. coli* extraintestinal (ExPEC) y *E. coli* diarreogénica (DEC) (Croxen & Finlay, 2010). Las ExPEC poseen cepas uropatógenas (UPEC) y meningitis neonatal (NMEC), entre las DEC existen seis patotipos conocidos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) o productora de la toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y el subtipo de adherencia difusa (DAEC) (Croxen & Finlay, 2010). Cada uno de los patotipos poseen una distribución geográfica y patogenia distinta, por lo que es de importancia la rápida identificación de patotipos DEC (Singh et al., 2019).

Figura 1

Sitios de colonización de patotipos de Escherichia coli



Nota: *E. coli* y su patotipos colonizan diferentes sitios del cuerpo humano causando infecciones urinarias, gastrointestinales, septicemia y meningitis. Recuperado de (Croxen & Finlay, 2010)

Escherichia coli extraintestinal (ExPEC)

Las cepas extraintestinales patógenas son las principales responsables de las infecciones del tracto urinario, del torrente sanguíneo, la próstata, sistema nervioso y otras infecciones alrededor del cuerpo a excepción del intestino y estrechamente relacionadas con nuevos genes de resistencia a los antibióticos (Manges et al., 2019).

Escherichia coli uropatógena (UPEC)

La *E. coli* uropatógena es la responsable en el 80% de los casos de infecciones relacionadas con el tracto urinario, cistitis y pielonefritis (Croxen & Finlay, 2010) estos cuadros clínicos son más comunes en mujeres por la proximidad de la uretra con la vagina y el ano (Iman, 2021), asimismo, las bacteriemias en adultos mayores son consecuencias de una infección urinaria primaria (Mueller & Tainter, 2021).

En cuanto a la patogenicidad de las cepas UPEC usa péptidos y aminoácidos como la fuente de carbono primordial para establecer ITU, por un lado, la capacidad de la bacteria de movilizarse por todo el tracto urinario indica un mecanismo de tropismo de órganos, también evade la inmunidad innata por medio de la micción (Croxen & Finlay, 2010).

El diagnóstico de una ITU se basa en los síntomas del paciente, la confirmación se realiza por medio de un uroanálisis/cultivo, en este último para la identificación y aislamiento se usa medios no selectivos (Agar cromo orientación) y selectivos (Agar BBL/ MacConkey), si el crecimiento de colonias en el agar evidencia una infección bacteriana, se procede hacer un antibiograma para determinar la resistencia a los antibióticos y que el médico responsable otorgue el tratamiento adecuado.

Escherichia coli meningitis neonatal (NMEC)

La *E. coli* asociada a meningitis neonatal y sepsis es la enfermedad más común en neonatos y su tasa de mortalidad se aproxima al 40% y aquellos que llegan a sobrevivir tiene graves secuelas neurológicas (Kaper et al., 2004). La patogenicidad de NMEC es complicada puesto que la bacteria debe pasar del intestino al torrente sanguíneo para ello el paciente debe tener una bacteriemia elevada, de esta manera atraviesa la barrera hematoencefálica conformada por células endoteliales microvasculares cerebrales para dirigirse al sistema nervioso central, en donde la bacteria presenta un conjunto de mecanismos de virulencia (FimH y OmpA) provocando inflamación meníngea, edemas y daño neuronal (Croxen & Finlay, 2010).

Escherichia coli diarreogénica (DEC)

Las cepas diarreogénicas descritas a continuación son los principales agentes etiológicos de diarreas en bebés, niños y adultos, encontradas en su gran mayoría en regiones con recursos limitados y con menor frecuencia en regiones de ricos recursos (Mueller & Tainter, 2021). Varios estudios han reportado la presencia de DEC híbridas con múltiples genes de virulencia, a pesar de que no se pueden descartar por la patogenicidad que podrían causar, en la actualidad no son consideradas en la clasificación de DEC (Singh et al., 2019).

Escherichia coli enteropatógena (EPEC)

E. coli enteropatógena fue de los primeros patotipos identificados como agente causal en casos pediátricos de diarreas acuosas contraídas por ingestión de alimentos contaminados y transmisión de persona a persona (Mueller & Tainter, 2021).

Esta cepa se caracteriza por la presencia del plásmido (pEAF) que codifica al gen *bfp* responsable de pilus formador de haces (Mueller & Tainter, 2021),

permitiendo que EPEC se adhiera a los enterocitos del intestino delgado, formando adherencias localizadas (AL) (Croxen & Finlay, 2010). Después de la unión, interviene el gen *eae* que codifica el factor de colonización de proteína de la membrana externa llamada intimina, este mejorará la adherencia. El gen *eae* se encuentra dentro del locus de la isla cromosómica de borramiento de enterocitos (LEE) la cual produce alrededor de 20 toxinas secretoras inyectadas al enterocito por una un inyector tipo III. Estas toxinas eliminan microvellosidades, aumenta la permeabilidad y subvierten la actina de la célula huésped (Croxen & Finlay, 2010).

EPEC tiene dos subtipos, la primera EPEC típica y EPEC atípica, la última se diferencia por poseer el gen *eae* (Oh et al., 2014).

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)

Las *E. coli* enterotoxigénicas provocan diarreas acuosas y es la principal causa de la llamada diarrea del viajero y enfermedades gastrointestinales pediátricas. Se encuentra en alimentos y aguas no potables (Mueller & Tainter, 2021).

ETEC se caracteriza por tener fimbrias colonizadoras que permiten la adherencia de la bacteria a la pared intestinal, además, de la expresión de toxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST), codificadas por el plásmido de la bacteria; cada toxina estimula la secreción de enzimas como la adenilciclase (AC) y guanilciclase que desencadena el aumento de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y subsiguiente la secreción de cloruro de las células de las criptas intestinales e inhibición de la absorción de cloruro de sodio por parte de las vellosidades intestinales, secretando agua en la luz intestinal, produciendo diarrea acuosa (Mueller & Tainter, 2021).

***Escherichia coli* enterohemorrágica / productora de la toxina Shiga
(EHEC/STEC)**

EHEC/STEC son productoras de la toxina Shiga 1 (*Stx1*) y toxina Shiga 2 (*Stx2*) relacionados estrechamente por *Shigella dysenteriae*. La *Stx2* es la causal de diarrea sanguinolenta, pudiéndose también expresar *Stx1*. Además, es responsable de brotes de diarrea después de la ingesta de alimentos contaminados como verduras, legumbres, carne de res, carne molida y productos lácteos crudos o mal cocinados. Además, que es el causante más común del síndrome urémico hemolítico en niños menores de cinco años y adultos mayores de 60 años (Mueller & Tainter, 2021). Las toxinas *Stx* son proteínas constituidas por subunidades AB bacterianas, la primera subunidad inhibe la síntesis de proteínas, mientras que la segunda subunidad B se enlaza al receptor de las células endoteliales llamado glucoesfingolípidos Gb3, que desencadena muerte celular de enterocitos y con ello colitis inflamatoria. Asimismo, como en EPEC las EHEC codifican intimina por lo que se adhieren al intestino provocando daño intestinal. Las células epiteliales también sufren daños y se desprenden de la membrana glomerular, ocasionando trombosis, anemia, daño renal la conocida triada del síndrome urémico hemolítico (SUH) (Mueller & Tainter, 2021).

***Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)**

E. coli enteroinvasiva es poco común causando enfermedades diarreicas y está relacionada con *Shigella* y al igual que otras cepas de *E. coli* se contrae por la ingesta de carnes mal cocinados y vegetales contaminados (Mueller & Tainter, 2021). La fisiopatología de esta cepa es distinta a las otras cepas diarreogénicas, porque no poseen adhesión a las células huésped (Croxen & Finlay, 2010) pero las enterotoxinas inducen diarrea secretora, la colonización a la mucosa, replicación y diseminación dando como resultado colitis inflamatoria (Mueller & Tainter, 2021).

EIEC se caracteriza por la expresión del gen *ipaH*, no obstante, la secuencia del gen no diferencia entre el patotipo y *Shigella* por lo que no pueden identificarse correctamente y en algunos casos existe una identificación errónea (Singh et al., 2019).

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

La *E. coli* enteroagregativa es considerada un patotipo reciente de las cepas diarreogénicas presente en países desarrollados y en vías de desarrollo. También considerado como la principal causante de diarrea acuosa aguda y crónica, que puede estar acompañada de mucosidad o sangre (Croxen & Finlay, 2010). Además, ha sido identificada con más frecuencia como agente etiológico de la conocida (Mueller & Tainter, 2021).

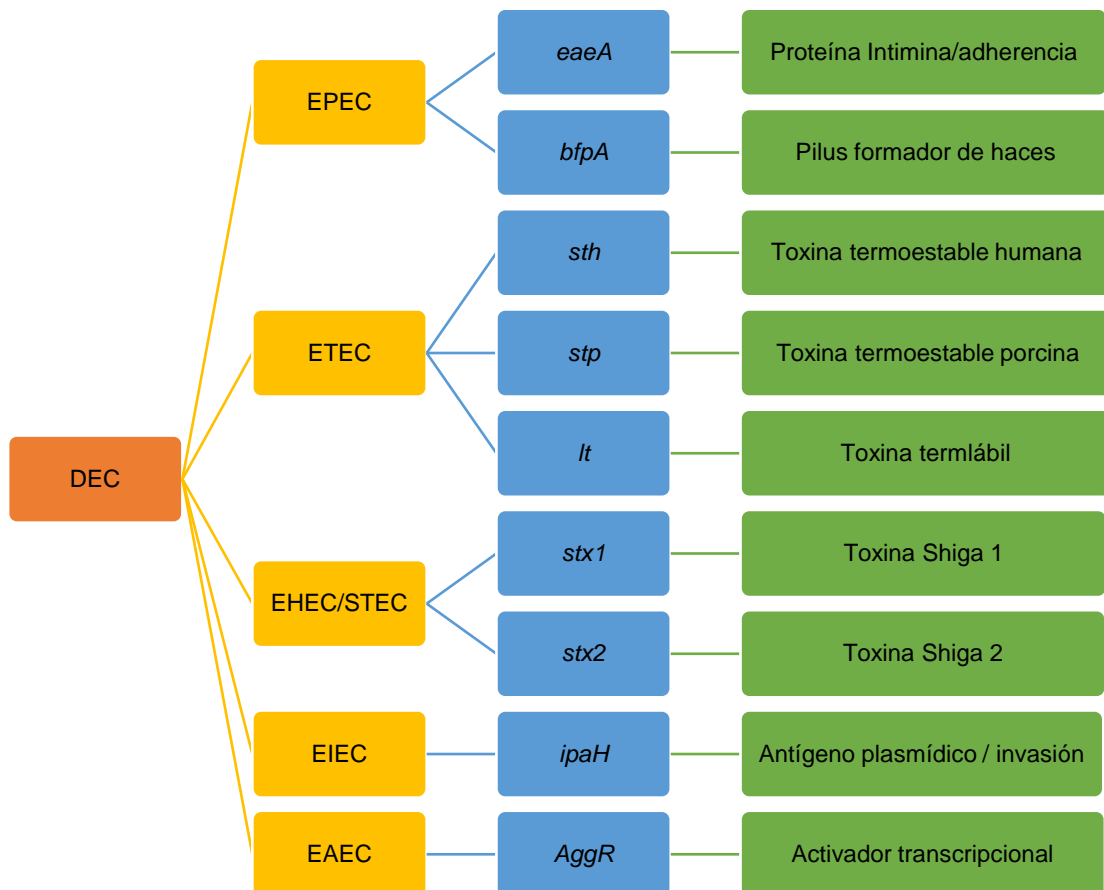
Los principales mecanismos de virulencia de la cepa son codificados por el activar transcripcional *AggR* que induce fimbrias de adherencia agregativa, adhesina, dispersina de proteína de superficie y enterotoxinas EAST-1, enterotoxina 1 de *Shigella* (ShET1) y ShET2 (Mueller & Tainter, 2021), careciendo de enterotoxinas termolábiles, estables al calor (Singh et al., 2019). EAEC también, es formador de biopelículas distintas a *E. coli* no patógena (Croxen & Finlay, 2010).

***Escherichia coli* adherencia difusa (DAEC)**

DAEC está relacionada en casos de diarrea en bebés de 0 a 12 meses (Kaper et al., 2004), niños de 18 meses a 5 años de edad (Croxen & Finlay, 2010) y se caracteriza por la presencia de células HEp-2 y HeLa. Otros de los mecanismos de virulencia incluyen adhesinas fimbriales y afimbriales como Afa-Dr en células huésped, de la misma forma, se secretan toxina autotransportadoras implicadas en lesiones de las uniones que se localizan con la infección Afa-Dr DAEC y en el aumento de la permeabilidad (Croxen & Finlay, 2010).

Figura 2

Genes de virulencia característicos de patotipos de *E. coli*



Identificación de *E. coli*

La identificación de *Escherichia coli* empieza primero con una evaluación clínica por medio de un profesional que sospeche de alguna infección bacteriana. Los síndromes clínicos que resultan en infecciones por *E. coli* patógenas son aquellas relacionadas con el tracto urinario, sepsis/meningitis y enfermedad entérica diarreica (Nataro & Kaper, 1998). Cuando, existe enfermedades causadas por patotipos de DEC en especial *E. coli* enterotoxigénica o enteroinvasiva un cultivo de heces no es necesario puesto que la diarrea se resuelve sin la necesidad de un tratamiento médico. Los cultivos son recomendados únicamente cuando la diarrea

es persistente y el medio utilizado con mayor frecuencia para su identificación es agar MacConkey (Mueller & Tainter, 2021).

Figura 3

E. coli fermentadora de lactosa en Agar MacConkey



La identificación de patotipos de *Escherichia coli* es de relevancia clínica para el control y manejo adecuado de las enfermedades causadas por DEC. En los últimos años se han desarrollado varios métodos para identificación/tipificación de DEC, serotipificación, electroforesis en gel de campo pulsado, tipificación satelital multilocus, análisis de repetición en tándem de número variable multilocus, ribotipificación y PCR multiplex (PCRm) (Singh et al., 2019).

Antibiograma

Los antibiogramas son herramientas empleadas en las instituciones de investigación para determinar en microorganismos aislados de pacientes para rastrear patrones de resistencia a ciertos compuestos químicos con acción antimicrobiana como el antibiótico sobre las bacterias, el antibiograma como tal es empleado para determinar a qué es susceptible un microorganismo y este ser usado para controlar infecciones en pacientes con concentraciones específicas evitando además toxicidad en este. Existen diversos métodos desarrollados por diversos laboratorios y de los cuales no todos tienen la aprobación de la FDA, un protocolo estandarizado que

actualmente es empleado y ampliamente recomendado es la dirección de M39 el cual proporciona recomendaciones sobre como recopilar, almacenar, analizar y presentar por lo que estas ayudan en el desarrollo de pautas para el tratamiento, monitoreo de resistencias y así llegar a la conclusión de que terapia es la recomendada para inhibir tal infección (Truong et al., 2021).

Hipótesis

Los alimentos obtenidos de los diferentes mercados de la ciudad de Quito presentan contaminación con *Escherichia coli* y patotipos de *E. coli*. Además, presentan resistencia a antibióticos de uso común para tratar infecciones producidas por las mismas.

Capítulo III

Materiales

Tabla 3

Materiales, equipos y reactivos utilizados en la investigación

Equipos, Reactivos y materiales	
Conservación de las muestras	<ul style="list-style-type: none"> • Microtubos de 1,5 mL • Asas estériles • Medio TSB • Glicerol • Pipetas Pasteur estériles • Vortex • Congelador • Caja de muestras
Obtención de muestras control	<ul style="list-style-type: none"> • Asas estériles • Vortex • Incubadora • Medio Tioglicolato • Agar MacConkey
Descongelamiento y cultivo de cepas	<ul style="list-style-type: none"> • Asas estériles • Vortex • Incubadora • Medio TSB • Agar cromó-orientación
Montaje de Antibiogramas	<ul style="list-style-type: none"> • Agar con la cepa • Medio TSB • Medio Mueller-Hinton • Discos de antibióticos • Hisopos • Pinzas • Mechero • Fósforos • Incubadora

	<ul style="list-style-type: none"> • Turbidímetro • Regla
Extracción de ADN de cepas congeladas (Método de ebullición o “Boiling”)	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra de la cepa • Asas estériles • Microtubos de 2 mL • Microtubos de 1,5 mL • Micropipeta 1000 µL • Puntas 1000 µL • Vortex • Termo bloque • Centrifuga • Temporizador • Guantes • Buffer de Elución
Extracción de ADN de cepas control	<ul style="list-style-type: none"> • Muestras cepas control • Asas estériles • Microtubos de 2 mL • Microtubos de 1,5 mL • Micropipeta 1000 µL • Puntas 1000 µL • Vortex • Termo bloque • Centrifuga • Temporizador • Guantes • Mini Kit de QIAGEN/QIAmp
Identificación de patotipos	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de flujo laminar • Termociclador • Microtubos de 2 mL • Tubos de PCR • Micropipeta 100-1000 µL • Micropipeta 20-200 µL • Micropipeta 0,5-10 µL • Puntas 1000 µL • Puntas 200 µL

	<ul style="list-style-type: none"> • Puntas 10 µL • Vortex • Centrifuga • Guantes • Agua libre de nucleasas • Cebadores • Dream Taq MM (2x) • Muestras de ADN
Observación de productos de PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Microondas • Balanza • Agitador magnético • Equipo de electroforesis • Fuente eléctrica • Probeta • Vasos de precipitación • Micropipeta • Gel de agarosa en polvo • Tampón TBE 10X • SYBR SAFE • Transiluminador UV

Nota: (propia elaboración)

Metodología

Participantes

El presente proyecto de investigación forma parte de un macroproyecto del cual se deriva el proyecto específico, el cual, fue realizado por la Sra. María Belén Jacome Hurtado con el apoyo financiero de Zurita & Zurita Laboratorios y la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) bajo el asesoramiento científico y técnico de la Dra. Jeannete Zurita, médica microbióloga; Gabriela Sevillano, ingeniera en biotecnología, en conjunto con el personal del área de microbiología y Biología molecular. También se obtuvo apoyo estratégico del Laboratorio de Análisis de Alimentos de La secretaria de Salud del Municipio Metropolitano de Quito.

Además, se contó con el asesoramiento (el director) del Dr. Armando Reina Ph. D, docente investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE Sede Santo Domingo.

Periodo de investigación

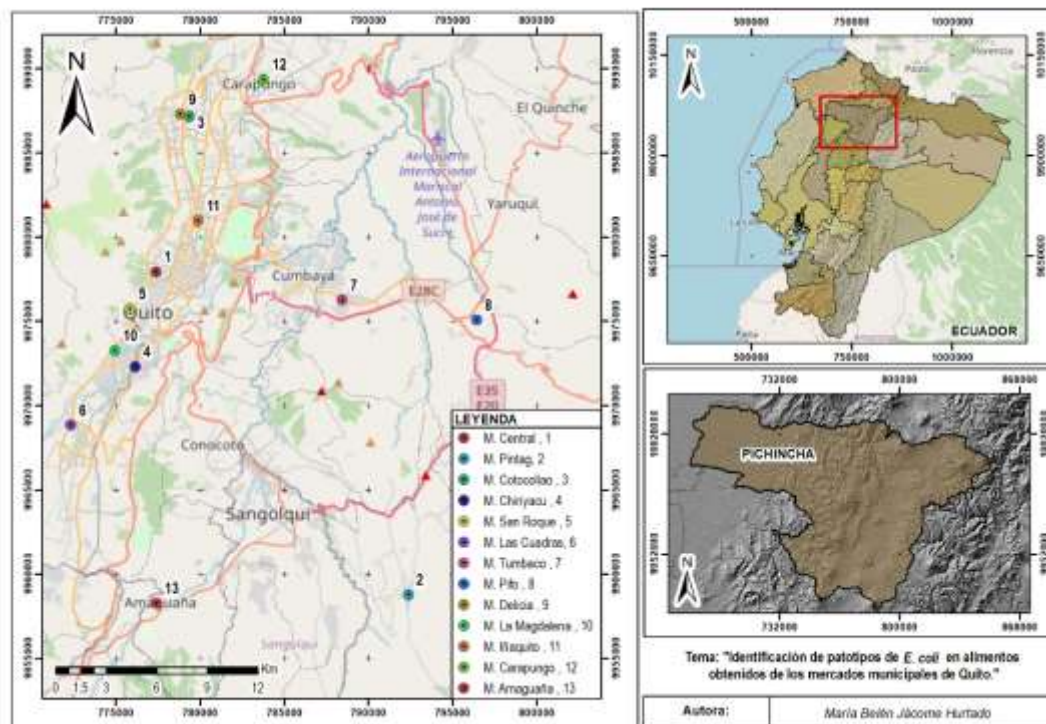
Las cepas utilizadas en la investigación fueron recolectadas por la secretaria de salud del Municipio Metropolitano de Quito, su posterior procesamiento y conservación se realizó en el área de Microbiología de Zurita y Zurita Laboratorios entre noviembre de 2020 y enero de 2021. El proyecto específico del cual se deriva el presente trabajo inició en el mes de agosto de 2021 y finalizó en diciembre del mismo año.

Zona de estudio

La investigación tuvo lugar en Quito, donde se recolectaron las muestras en diferentes mercados municipales de la ciudad (Mercado Central, Pintag, Cotacollao, Chiriyacu, San Roque, Las Cuadras, Tumbaco, Pifo, Delicia, La Magdalena, Iñaquito, Carapungo, Amaguaña). Las muestras fueron procesadas en el área de Microbiología y Biología Molecular de Zurita & Zurita Laboratorios-Matriz.

Figura 4

Ubicación geográfica del área de investigación



Nota: Ubicación geográfica de los mercados municipales en donde se realizó el muestreo en la ciudad de Quito.

Recolección e identificación muestras previo al estudio

Se recolectaron 181 muestras de diferentes fuentes de alimentos (carnes crudas, verduras, alimentos cocinados, salsas, ensaladas, entre otros) con la colaboración del Laboratorio de Análisis de alimentos de la secretaria de salud del Municipio Metropolitano de Quito. Las muestras fueron sembradas en medio de enriquecimiento, caldo tríptico de soya (TSB), posterior a ello se hizo pase a medio ESBL y MacConkey, donde se identificaron y aislaron las cepas de color rosado, característico de *E. coli* fermentadoras de lactosa.

Conservación de muestras

Se usaron microtubos de 1,5 mL previamente identificados con el número de registro de cada muestra, se dispensó 500 µL de medio TSB, con un asa estéril se toma una cantidad considerable de la colonia aislada y sembradas anteriormente en agar Mac Conkey y ESBL. Una vez sembrada la muestra en el medio se procede a colocar 500 µL de Glicerol. Finalmente, se da vortex durante 3 segundos antes de congelarlas a -20 °C.

Desarrollo Experimental

Obtención de cepas control

Los controles para la identificación por biología molecular de los patotipos de *E. coli* (EPEC, ETEC, STEC, EIEC y EAEC) se obtuvieron gracias a la generosidad del Dr. Gabriel Trueba del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Los que fueron entregados en medio semisólido LB y en agar Mac Conkey sin previa confirmación por biología molecular. Al llegar las muestras al laboratorio se las incubó durante 24h, para después hacer pase en medio de enriquecimiento Tioglicolato y finalmente en agar Mac Conkey. Las cepas control fueron positivas para los ocho genes de virulencia incluidos en la PCR multiplex.

Tabla 4

Controles patotipos de E. coli

TIPO DE PATOTIPO	CÓDIGO DEL CONTROL	FUENTE
EPEC típica	4183	Hospital Voz Andes
EPEC atípica	EPECa	USFQ
STEC	STEC ATCC	USFQ
EIEC	Q31.6	USFQ
EAEC	B164.1	USFQ

Descongelamiento y cultivo de cepas

Para el descongelamiento y la reactivación de las cepas se inoculó una alícuota de 50 µL con una pipeta Pasteur estéril de los microtubos de almacenamiento de cada cepa en medio TSB y se incubó. Pasado un periodo de 24h en la incubadora con un asa de siembra estéril de 10 µL se tomó un inóculo del medio TSB agitando vigorosamente y se sembró en Agar Cromo orientación por el método de agotamiento para confirmar la presencia de *E. coli* y descartar contaminación en las cepas congeladas. Las cajas fueron llevadas a la incubadora por 24 h a 37°C y los microtubos se devolvieron al congelador. A las cepas que se presentaron de color azul en el Agar Cromo orientación se les realizó pruebas Bioquímicas para su identificación.

Montaje de antibiogramas

Se obtuvo el CMI de las cepas identificadas como *E. coli* utilizando la Técnica de difusión por disco o también llamada Kirby-Bauer, la cual consiste en seleccionar de 4 a 5 colonias aisladas en Agar cromo orientación. Las colonias se transfirieron con un hisopo estéril a un tubo con medio TSB previamente rotulado con el número correspondiente de cada cepa y se midió la turbidez equivalente a 0.5 de la escala de McFarland. Se sumergió un hisopo estéril agitando vigorosamente, escurriendo en las paredes del mismo tubo; se estrió en el medio sólido Mueller-Hinton, se dejó secar durante cinco minutos. A continuación, se colocaron los discos con ayuda de pinzas estériles, presionando los discos ligeramente sobre el agar.

Los antibióticos seleccionados para este estudio fueron: cefoxitina (FOX), trimethoprim-sulfametoxazol (SXT), amikacina (AMK), aztreonam (ATM), ciprofloxacino (CIP), ertapenem (ETP), fosfomicina (FOS), gentamicina (GM), ampicilina/sulbactam (SAM), tetraciclina (TE), Tigeciclina (TGC), piperacilina-tazobactam (TZP). Los puntos de corte de cada antibiótico se evaluaron en base a la guía M100-S21 del CLSI.

Extracción de ADN de cepas congeladas

La extracción de ADN de las muestras se realizó por la técnica de Boiling, que consiste en tomar aproximadamente 1 μL de muestra bacteriana con un asa estéril y colocar en un microtubo con 300 μL de Buffer de elución, se dio vortex y se incubó durante 30 minutos en termo bloque a una temperatura de 95°C, se centrifugó a 13 300 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se hizo pase del sobrenadante a otro microtubo.

Extracción de ADN de los controles

La extracción de ADN de los controles positivos de los cinco diferentes patotipos se realizó con el DNA Mini Kit de QIAGEN/QIAmp (250).

PCR Multiplex para identificación de patotipos

Se realizó el protocolo de PCR multiplex de un solo paso con nueve cebadores de Kyuang-Hwa Oh (2014) con algunas modificaciones para la identificación de los cinco patotipos de *E. coli* (EPEC, ETEC, EHEC/STEC, EAEC, EIEC). Para la mezcla master y las condiciones de PCR, se optó por los reactivos y volúmenes descritos en las Tablas 4 y 5. El ADN amplificado se separó mediante un gel de agarosa al 2%, que se tiñó con SYBR SAFE y se visualizó con transiluminación UV. Para estandarizar la PCR se probaron los cebadores en las concentraciones indicadas en el protocolo ya preestablecido junto con los controles de ADN positivos otorgados por la Universidad San Francisco en volúmenes de 2, 5 y 6 μL .

Tabla 5*Cebadores y criterios para identificación de patotipos de E. coli*

Gen	Primer	Secuencia del cebador (5' a 3')
EHEC <i>stx2</i>	EC-vt2_2-F	TACCACTCTGCAACGTGTGCG
	EC-vt2_2-R	CGATACTCCGGAAGCACATT
EHEC <i>stx1</i>	EC-vt1_2-F	CGTCTTTACTGATGATTGATAGTGCC
	EC-vt1_2-R	CGCGATGCATGATGATGAC
ETEC <i>sth</i>	ET-ST_(C)-F	TTCGCTCAGGATGCTAAACCA
	ST-148R	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG
ETEC <i>lt</i>	ET-LT-F	GTA CTTCGATAGAGGAACTCAAATGAATAT
	ET-LT-R	ATT CTG GGT CTC CTC ATT ACA AGT ATC
EPEC <i>eaeA</i>	eaeA 220F	CGG CGA TTA CGC GAA AGA
	eaeA 220R	CCTAAATTTGCCGTAAAGCGG
EPEC <i>bfpA</i>	EP-bfpA(400)-F3	AGAATGCTATTTTCAGAAGTAATGAGCG
	EC-bfpA-R	TTACATGCAGTTGCCGCTTC
EAEC <i>aggR</i>	EC-aggR-F3	TTAAAATAAGTCAARAATTGTTTTGGTGTTA
	EC-aggR-R3	ATTATAAAAATTAACAATATCAGAATACATCAG TACAC
EIEC <i>ipaH</i>	Sh-ipF1	CCTTTTCCGCGTTCCTTGA
	Sh-ipR3	CAGCAGCAACAGCGAAAGAC

Nota: Recuperado de (Oh et al., 2014a)**Tabla 6***Reactivos de mezcla master de PCR multiplex-patotipos de E. coli/Primer ensayo*

Reactivos	Unidad	Volumen (µL)
H ₂ O libre de nucleasas	-	1
Dream Taq MM (2x) *	10x	10
Mezcla de cebadores	µM	4
ADN	-	5
Volumen final		20

Nota: Mezcla master con un volumen de 5 µL de ADN usada para estandarización de la PCR.

Tabla 7

Reactivos de mezcla master de PCR multiplex-patotipos de E. coli/Segundo ensayo

Reactivos	Unidad	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	-	0
Dream Taq MM (2x) *	10x	10
Mezcla de cebadores	μM	4
ADN	-	6
Volumen final		20

Nota: Mezcla master con un volumen de 6 μL de ADN usada para estandarización de la PCR.

Tabla 8

Reactivos de mezcla master de PCR multiplex-patotipos de E. coli/Ensayo final

Reactivos	Unidad	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	-	4
Dream Taq MM (2x) *	10x	10
Mezcla de cebadores	μM	4
ADN	-	2
Volumen final		20

Nota: Mezcla master final con un volumen de 2 μL de ADN utilizada con las muestras de ADN de las cepas aisladas de los alimentos obtenidos de la ciudad de Quito. *Premezcla de ADN polimerasa (ThermoScientific DreamTaq Green PCR Master Mix 2x).

Tabla 9*Condiciones de PCR-patotipos de E. coli*

Ciclo	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95	15 min
	Desnaturalización	95	30 s
40	Hibridación	58	1 min
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	10 min
-	Mantenimiento	4	-

Nota: Recuperado de (Oh et al., 2014a)**Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados se usó estadística descriptiva con el fin de evaluar la frecuencia de *E. coli* y patotipos en muestras de alimentos y la susceptibilidad a los antibióticos a través de porcentajes. Además, permitir el contraste con reportes de otros países a nivel mundial.

Capítulo IV

Resultados

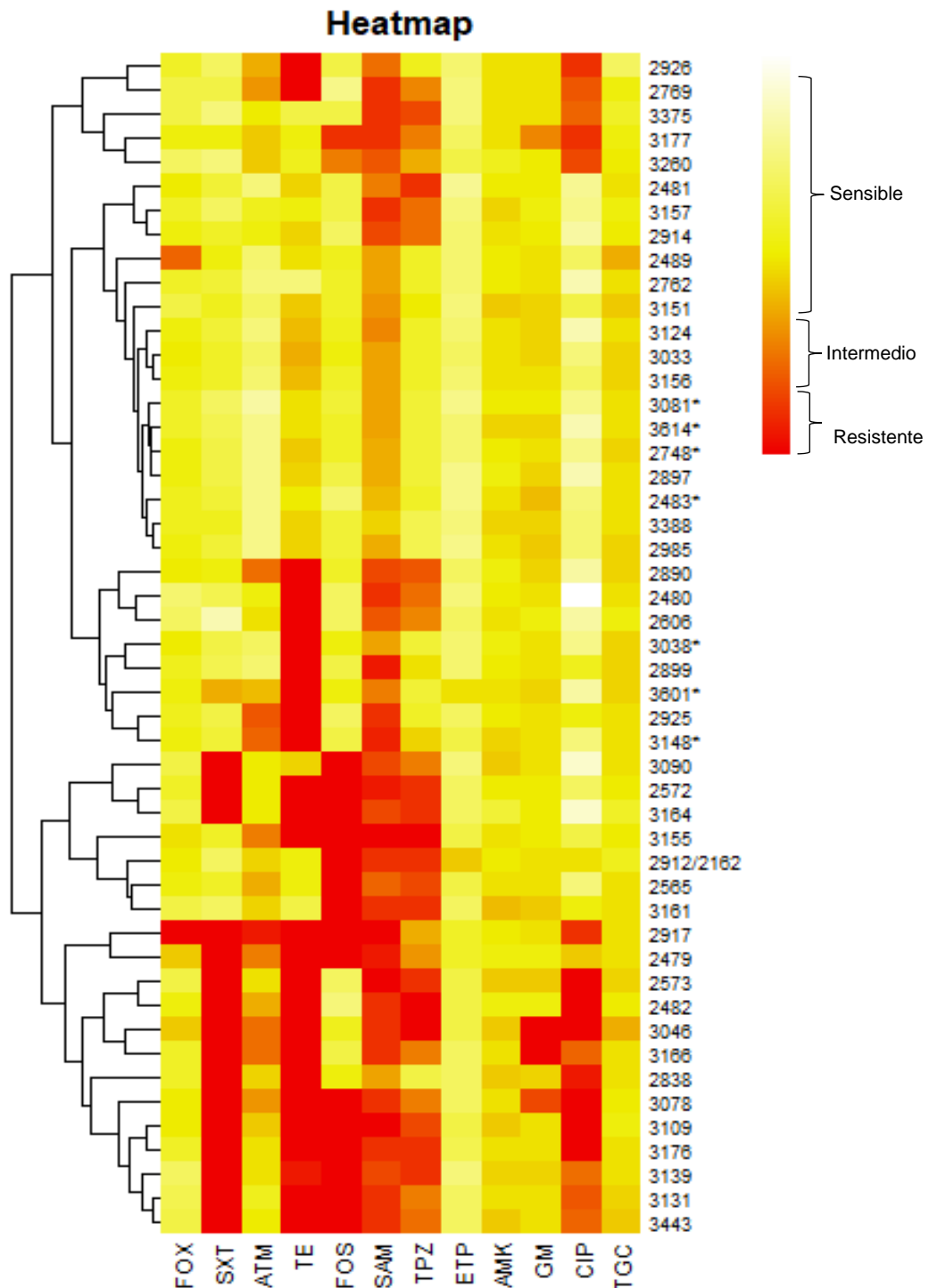
Diferencia entre la susceptibilidad a los antibióticos en cepas de *E. coli* y diarreogénicas

El análisis de resistencia y sensibilidad a los antibióticos fue hecho según el Instituto de estándares clínicos y de laboratorios (CLSI) 2021. De las 49 cepas de *E. coli*, 42 (85,71%) fueron *E. coli* no diarreogénicas y 7 (14,29%) *E. coli* diarreogénicas. En el macroproyecto realizado en Zurita se identificaron previamente que de las 42 *E. coli* no diarreogénicas, 30 cepas eran BLEE, por lo que se observó una multirresistencia a los antibióticos, a diferencia de los 19 aislamientos de *E. coli* restantes que presentaron una alta sensibilidad a los antibióticos. Ertapenem, amikacina, y Tigeciclina fueron los antibióticos con mayor frecuencia de sensibilidad (49/49; 100%), cefoxitina (47/49; 95,91%), gentamicina (46/49; 93,88%), aztreonam (41/49; 83,67%), trimethoprim-sulfametoxazol (33/49; 67,34%), fosfomicina (33/49; 67,34%), ciprofloxacino (32/49; 63,30%), ampicilina/sulbactam (26/49; 53,06%), tetraciclina (24/49; 95,91%), piperacilina-tazobactam (23/49; 46,93%).

La resistencia a los antibióticos se detectó en 3/7 (42,85%) de *E. coli* diarreogénica. La resistencia a la tetraciclina, ampicilina/sulbactam y aztreonam, se observó en 3/7 (42,85%), 1/7 (14,28%) y 1/7 (14,28%) respectivamente. Solo una cepa positiva para ETEC recuperada de una muestra de carne de res cruda fue resistente a tres antibióticos.

Figura 5

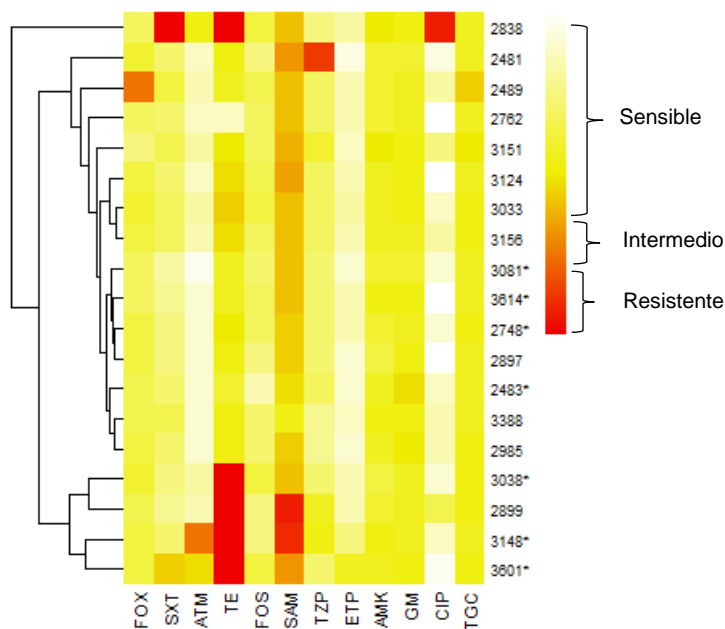
Mapa de calor para visualizar la susceptibilidad de *E. coli* a los antibióticos



Nota: *: patotipos *E. coli*, Número sin *: representa *E. coli* comensales. FOX: cefoxitina, SXT: trimethoprim-sulfametoxazol, AMK: amikacina, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacino, ETP: ertapenem, FOS: fosfomicina, GM: gentamicina, SAM: ampicilina/sulbactam, TE: tetraciclina, TGC: tigeciclina, TPZ: piperacilina-tazobactam.

Figura 6

Mapa de calor para visualizar la susceptibilidad a los antibióticos de las *Escherichia coli* diarreogénicas no BLEE y *E. coli* diarreogénicas



Nota: *: patotipos *E. coli*, Número sin *: representa *E. coli* comensales. FOX: cefoxitina, SXT: trimethoprim-sulfametoxazol, AMK: amikacina, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacino, ETP: etrapenem, FOS: fosfomicina, GM: gentamicina, SAM: ampicilina/sulbactam, TE: tetraciclina, TGC: tigeciclina, TPZ: piperacilina-tazobactam.

Tabla 10

Productos alimenticios contaminados con patotipos de *E. coli* diarreogénica y susceptibilidad a los antibióticos.

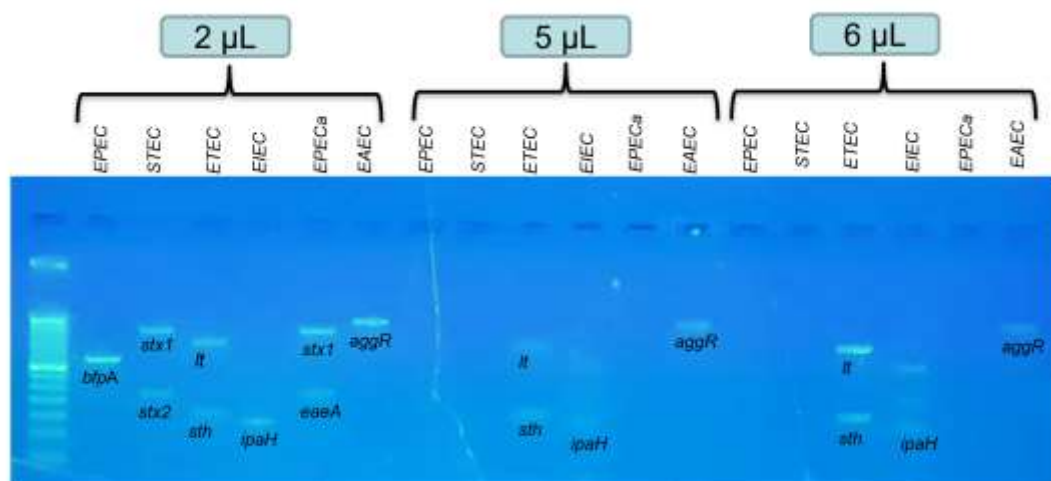
No. muestra	Patotipos	Genes	Muestra de Alimento	Resistencia
3148	ETEC	sth+lt	Carne de res	ATM, TE, SAM
2748	ETEC	sth	Carnes de res	-
3038	ETEC	sth	Legumbres (Menestra)	TE
3081	ETEC	sth	Salsa (ají)	-
2483	EPEC	eaeA	Carne de res	-
3601	EPEC	eaeA	Legumbres (chochos)	TE
3614	EHEC	stx1+stx2	Otros (sopa)	-

PCR Multiplex para diferenciación de patotipos

Antes de realizar la PCR multiplex con las muestras de ADN proveniente de los alimentos de los mercados municipales de la ciudad de Quito se hicieron pruebas preliminares para estandarizar la cantidad de reactivo y las condiciones de PCR con el ADN de las cepas control en diferentes volúmenes. Se seleccionó el menor volumen de ADN (2 μ L) para las condiciones de la mezcla master, por la claridad de las bandas en el gel de agarosa al 2%.

Figura 7

Resultados de la PCR-patotipos de *E. coli* diarreogénica con ADN de cepas control en gel de agarosa al 2%



Nota: Se muestra los resultados de la PCR con diferentes volúmenes de ADN de las cepas control. Primer pocillo: Ladder 50 pb, EPEC: *bfpA* (400 pb), STEC: *stx1* (637 pb) y *stx2* (297 pb), ETEC: *sth* (167 pb) y *lt* (500 pb), EIEC: *ipaH* (141 pb), EPECa: *eaeA* (248 pb), EAEC: *aggR* (715 pb).

Identificación de cepas de *E. coli* en productos alimenticios

Se analizaron los datos y cepas congeladas de las 181 muestras de un estudio previo en diferentes mercados de la ciudad de Quito, Ecuador, en donde se identificó previamente coliformes, *Escherichia coli* y en el presente estudio se realizó caracterización de patotipos de *E. coli*.

Se detectaron productos alimenticios contaminados con *E. coli* (49/181; 27%); el pollo (5/5; 100%) y embutidos/vísceras (13/19; 68,4%) son los alimentos contaminados con mayor frecuencia con *E. coli*. Las muestras con menor contaminación de *E. coli* fueron aquellos de la clasificación otros (1/11; 9,1%), en donde había una variedad de alimentos cocinados recolectados de los mercados municipales.

Tabla 11

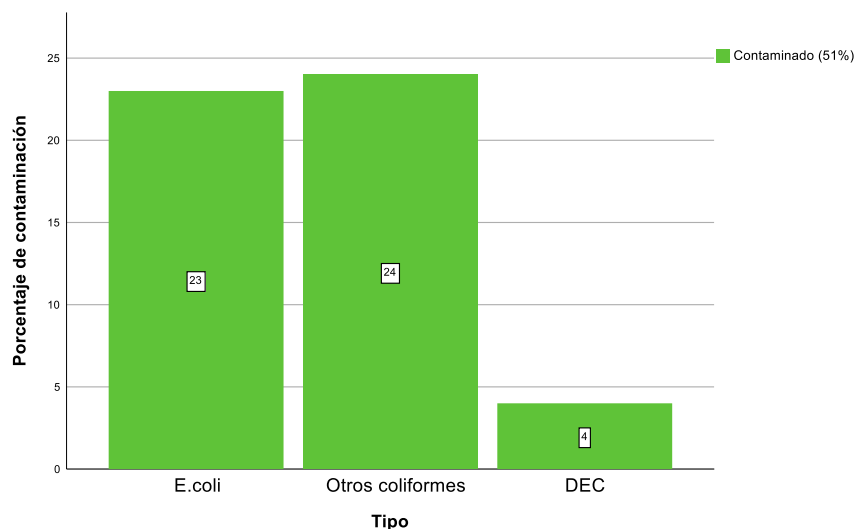
Productos alimenticios contaminados con coliformes, E. coli y patotipos de E. coli

Tipos de alimentos	Coliformes		<i>E. coli</i>		Patotipos	
	No.	%	No.	%	No.	%
Carne de res	8 (16)	50	6 (16)	37,5	3	18,8
Embutidos/vísceras	15 (19)	78,9	13 (19)	68,4	0	0
Queso	7 (8)	87,5	3 (8)	37,5	0	0
Pollo	5 (5)	100	5 (5)	100	0	0
Carne de cerdo	2 (5)	40	0 (5)	0	0	0
Frutas/jugos	2 (8)	25	0 (8)	0	0	0
Legumbres	11 (27)	40,7	3 (27)	11,1	2	7,4
Vegetales	15 (28)	53,6	8 (28)	28,6	0	0
Salsas	24 (45)	53,3	10 (45)	22,2	1	2,2
Otros	4 (11)	36,4	1 (11)	9,1	1	9,1
Huevos /pescado	0 (9)	0	0 (9)	0	0	0
Total	93 (181)	51,4	49 (181)	27,1	7 (181)	3,9

Nota: Número de muestras positivas contaminadas con coliformes, *E. coli* y patotipos de *E. coli* diarreogénica. Número en paréntesis representa el total de muestras analizadas. Otros: sopa, ceviche, seco de pollo.

Figura 8

Gráfico de barras para indicar porcentajes de contaminación por coliformes y *E. coli* en productos alimenticios.



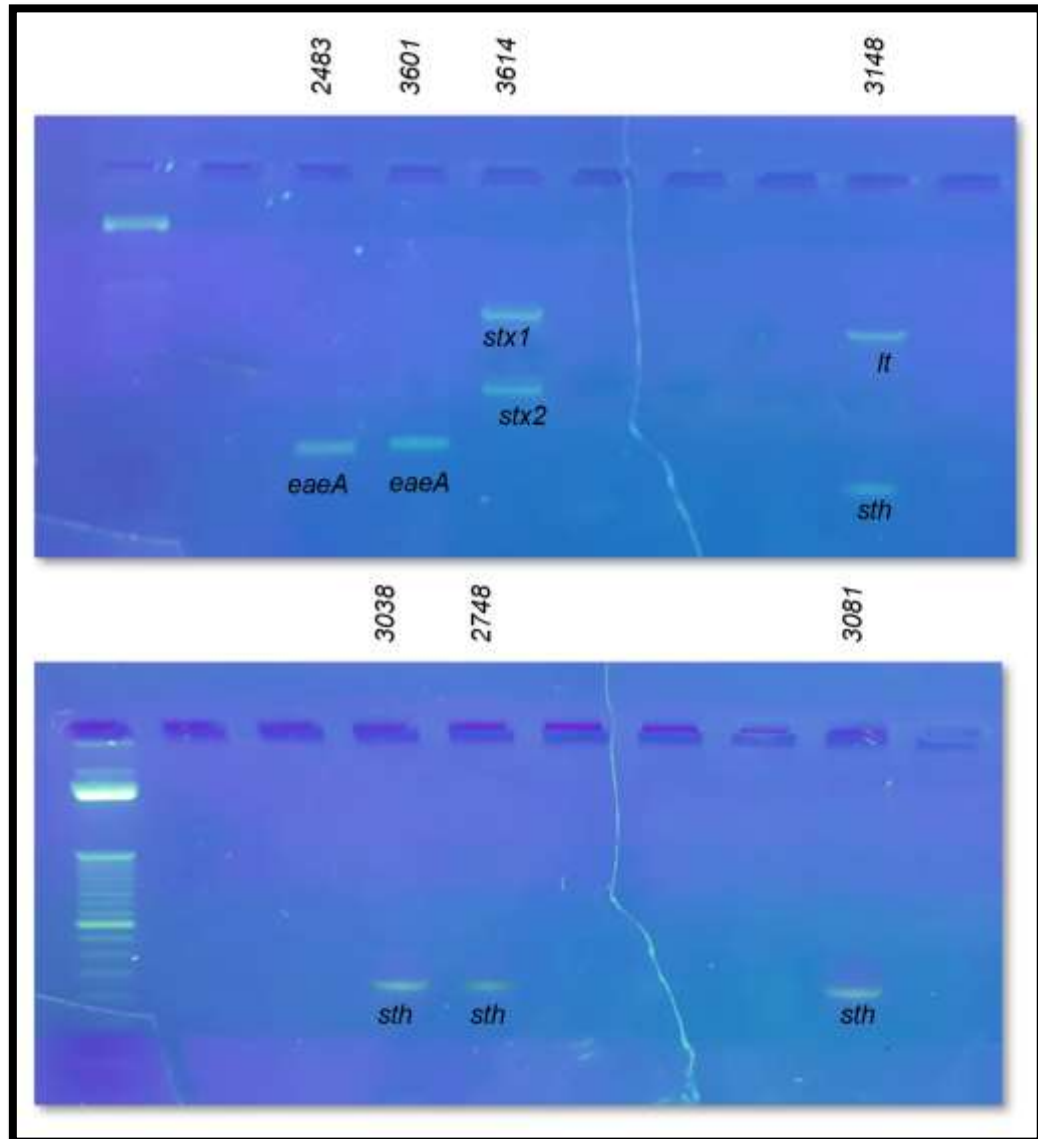
Nota: Se puede observar que de 181 muestras el 49% fue negativa a contaminación, el 51% restante presentó contaminación dividiéndose en *E. coli* (23%), *E. coli* diarreogénica (4%) y otros coliformes (24%).

Aislamientos de DEC presentes en muestras de alimentos

Las *E. coli* diarreogénicas (DECs) son aquellas que portan los genes de virulencia determinantes para los cinco patotipos (EPEC, ETEC, EHEC/STEC, EAEC y EIEC). En este estudio se diferenciaron cepas con amplificación positiva para los genes de virulencia correspondiente a EPEC (*eae*), ETEC (*stx1* y *stx2*), EIEC (*lt* y *sth*) (Figura 7). Por lo que, se identificaron 7 patotipos (3,9%) de las 181 muestras de alimentos. La frecuencia de contaminación de muestras de DEC en todas las muestras positivas para *E. coli* fue de 14,28%.

Figura 9

Resultados PCR de las muestras de alimentos en gel de agarosa al 2%



Nota: Primer pocillo: Ladder de 50 pb; **2483-3601:** eaeA (248 pb); **3614:** stx1 (637 pb)+stx2 (297 pb); **3148:** lt (500 pb) +sth (167 pb); **3038,2748,3081:** sth (167 pb).

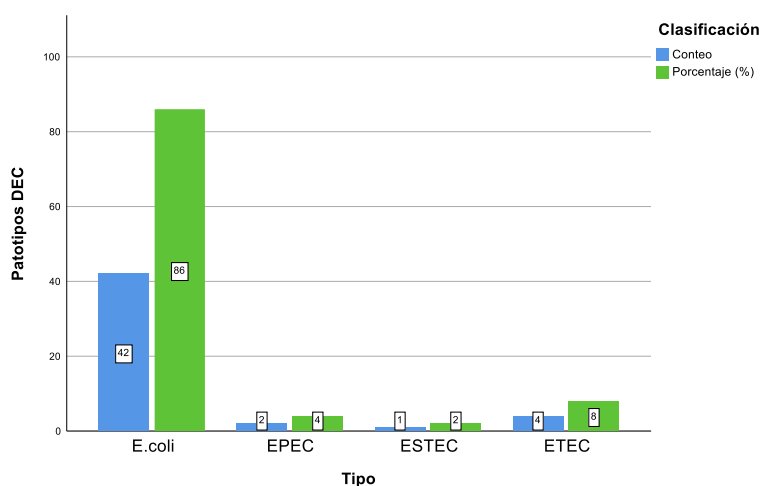
Tabla 12

Porcentaje de cepas con amplificación positiva para genes de virulencia correspondiente a patotipos de *E. coli* diarreogénica (DEC)

Patotipos	Genes	No. Cepas con amplificación positiva	%
EHEC	stx1	0	0,00
	stx2	0	0,00
	stx1 + stx2	1	2,04
ETEC	lt	0	0,00
	sth	3	6,12
	lt + sth	1	2,04
EPEC	eaeA	2	4,08
	bfpA	0	0,00
	eaeA + bfpA	0	0,00
EAEC	aggR	0	0,00
EIEC	ipaH	0	0,00
Total		7 (49)	14,28

Figura 10

Gráfico de barras para indicar porcentajes de patotipos de DEC en productos alimenticios contaminados con *E. coli*

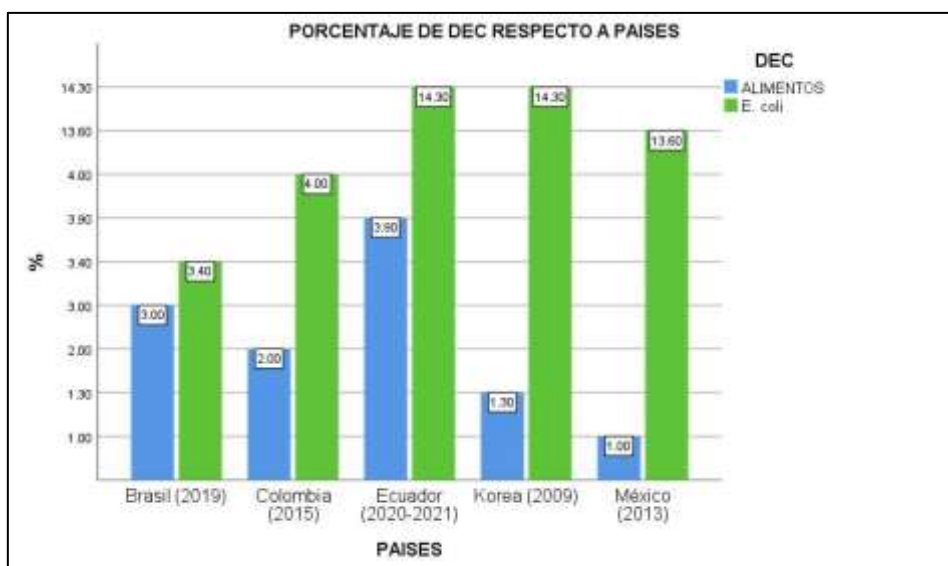


Nota: En la figura se observa el porcentaje de *E. coli* (49; 86%) y patotipos de *E. coli* diarreogénica (7; 14,28%), clasificándose en tres patotipos encontrados EPEC (2; 4%), ETEC (4; 8%), STEC (1; 2%).

Los productos alimenticios contaminados con DEC fueron siete, de los cuales, tres muestras se encontraron en carne de res cruda, 2 en legumbres, 1 en salsas y 1 en otros (Tabla 12). Dos de las muestras de carne de res cruda, menestra y ají fueron positivas para uno o más genes de virulencia de ETEC; una muestra de carne de res y legumbres (chochos) estuvieron contaminados con EPEC. Finalmente, una muestra correspondiente a sopa estuvo contaminada con EHEC.

Figura 11

Gráfico de barras aplicado para comparar los porcentajes de DEC encontrados en productos alimenticios en varios países



Capítulo V

Discusión

Diferencia entre la susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *E. coli* y diarreogénicas

Según Amézquita-Montes et al. (2015), existe una baja resistencia a los antibióticos en los patotipos de *E. coli* puesto que sus resultados fueron similares a los vistos en este estudio. A diferencia de Ecuador se ha aislado *E. coli* enteropatógena resistente a múltiples fármacos (ampicilina, ciprofloxacino, levofloxacino, nitrofurantoina, trimetoprim/sulfametoxazol) del río Machángara en Quito (Egas Vivero, 2016), lo que sugiere que existen patotipos de *E. coli* (DEPs) multirresistentes circulando en la ciudad.

Identificación de cepas de *E. coli* en productos alimenticios

E. coli diarreogénica (DEC) es la principal causa de infecciones gastrointestinales alrededor del mundo (Chandra et al., 2013). En Ecuador, la segunda causa de morbi-mortalidad es provocada por enfermedad diarreica (Rojas Silva, 2008). El 10,8% de niños menores de 5 años padecen de alguna enfermedad diarreica, este porcentaje aumenta en zonas rurales (12,8%) mientras que en zonas urbanas (9,8%) es menor según el Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC, 2018).

El presente estudio demostró contaminación con coliformes fecales en 51,4% de productos alimenticios recolectados entre noviembre de 2020 y enero de 2021. En un boletín emitido por el Ministerio de Salud Pública (2021) indica que el número de casos reportados de enfermedades transmitidos por alimentos ha disminuido considerablemente en los dos últimos años (Tabla 1). Esto podría deberse a las nuevas prácticas de higiene implementadas durante la Pandemia por COVID-19. A pesar de que existe casos reportados por ETAS no se especifica a *E. coli*

diarreogénica como uno de los causantes, pero lo abarcan en intoxicaciones alimentarias bacterianas.

Aislamientos de DEC presentes en muestras de alimentos

El porcentaje de contaminación de DEC en muestras y *E. coli* positivas es alta comparado con otros estudios de alimentos en Latinoamérica (Figura 9), Amézquita-Montes et al. (2015), en Colombia (4.0%), Canizalez-Roman et al. (2013), en México (13,6%), Tanabe et al. (2019), en Brasil (3%), sin embargo, el porcentaje de DEC en *E. coli* por Lee et al. (2009), en Corea (14,3%) es similar al obtenidos en este estudio.

Se observo contaminación por ETEC, EPEC y STEC en carnes crudas, legumbres (chochos), alimentos preparados (ají), alimentos cocinados (sopa y menestra). Ambas cepas de EPEC que fueron reconocidas en productos alimenticios son atípicas, puesto que solo codifican el gen de adherencia *eaeA* y no el gen *bfp* (Campos et al., 2015). Se ha reportado la presencia de patotipos semejantes en un estudio en Colombia, con la diferencia de que fueron encontrados en productos alimenticios distintos a los de nuestro estudio (Amézquita-Montes et al., 2015).

La contaminación con cepas enteropatógenas (EPEC) en carnes de res cruda está justificada porque bovinos, zonas de producción y procesamiento de carne son fuentes con alta frecuencia de EPEC atípicas (Monaghan et al., 2013). En tanto la contaminación por ETEC está relacionada como patógeno transmitido por agua, que por productos alimenticios (Daniels et al., 2000). Sin embargo, si se ha reportado casos de contaminación de ETEC en ensaladas (Castro-Rosas et al., 2012), carne molida (Amézquita-Montes et al., 2015) y productos lácteos (Canizalez-Roman et al., 2013).

La contaminación de *E. coli* diarreogénicas en legumbres, salsas (ají) y alimentos cocinados puede deberse a la necesidad de agua en la preparación, que en algunas ocasiones se utiliza directamente del grifo. Otra fuente de contaminación de salsas podrían ser las verduras, a causa de que en Ecuador el agua de riego usada en los cultivos y las verduras cosechadas se encuentran contaminadas con *E. coli* (Montero et al., 2021) es posible que la contaminación sea demasiada que las prácticas de desinfección de las mismas no sean suficientes para reducir la contaminación fecal (Castro-Rosas et al., 2012).

Según Campos et al. (2015) los manipuladores de alimentos influyen en la mala calidad microbiológica y seguridad de los alimentos, puesto que se encontró contaminación con microorganismos patógenos intestinales, *E. coli* y los patotipos EPEC y STEC, no solo en alimentos también en las manos de los vendedores. Esto puede deberse a una mala higiene y deficiente lavado de manos, explicando la contaminación en alimentos preparados y cocinados.

El presente estudio tuvo varias limitaciones. En primer lugar, la investigación es parte de un macroproyecto en donde intervinieron varias instituciones y personal de laboratorio, por lo que la recolección y análisis de datos no puede ser completamente generalizable. En segundo lugar, el análisis de datos y el tamaño de la muestra en cada uno de los mercados era demasiado pequeña y no homogénea para realizar análisis multivariados lo que limitó la estadística para detectar diferencias significativas entre los diferentes mercados. Este estudio es únicamente descriptivo y no de prevalencia.

Capítulo VI

Conclusiones

La presencia de cepas de *E. coli* diarreogénicas (DEC) en productos alimenticios en los mercados municipales de Quito, aparecen con una frecuencia del 3,9 % lo que coincide con otras investigaciones donde la prevalencia de *Escherichia coli* diarreogénica en productos alimenticios no supera el 10% en el total de las muestras recolectadas.

Se determinó una baja resistencia a los antibióticos en cepas DEC, sin embargo, el 43% resultaron resistentes a tetraciclina.

Los genes de virulencia circundantes con mayor frecuencia en productos alimenticios pertenecen a los patotipos de ETEC y EPEC atípicas, usualmente encontrados en otras investigaciones donde se analizan aislados de heces humanas.

Las fuentes de contaminación con *E. coli* son variadas durante toda la cadena de procesamiento de los alimentos lo que sugiere que se debe mejorar la calidad del agua de riego utilizada en los cultivos, las prácticas de manipulación de alimentos e higiene personal, ya que estos son factores que ponen en riesgo a la población de adultos y niños en contraer enfermedades transmitidas por alimentos.

Capítulo VII

Recomendaciones

Se recomienda realizar el mismo estudio enfocando la investigación en alimentos con mayor frecuencia de patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica, y en otros mercados a nivel nacional, para realizar comparaciones entre ciudades o regiones.

Diseñar o buscar un cebador para la determinación del gen *stp* responsable de codificar la toxina termoestable porcina y ver si esta circula en muestras de alimentos en Ecuador.

Es necesario mejorar las prácticas de manipulación y procesamiento de alimentos debido a que pone en riesgo a la población de adquirir enfermedades transmitidas por alimentos.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Amézquita-Montes, Z., Tamborski, M., Kopsombut, U. G., Zhang, C., Arzuza, O. S., & Gómez-Duarte, O. G. (2015). Genetic Relatedness Among *Escherichia coli* Pathotypes Isolated from Food Products for Human Consumption in Cartagena, Colombia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(5), 454.
<https://doi.org/10.1089/FPD.2014.1881>
- Binnicker, M. J. (2015). Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: Performance, result interpretation, and cost-effectiveness. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(12), 3723–3728. <https://doi.org/10.1128/JCM.02103-15/ASSET/A6003967-AEB3-4F12-A4C2-21B59BAE59CF/ASSETS/GRAPHIC/ZJM9990945740002.JPEG>
- Campos, J., Gil, J., Mourão, J., Peixe, L., & Antunes, P. (2015). Ready-to-eat street-vended food as a potential vehicle of bacterial pathogens and antimicrobial resistance: An exploratory study in Porto region, Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.04.016>
- Canizalez-Roman, A., Gonzalez-Nuñez, E., Vidal, J. E., Flores-Villaseñor, H., & León-Sicairos, N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 36–45.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.03.020>
- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A., & Estrada-Garcia, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 176–180.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.025>

Chandra, M., Cheng, P., Rondeau, G., Porwollik, S., & McClelland, M. (2013). A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(4), 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.013>

Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(1), 26–38. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2265>

Daniels, N. A., Neimann, J., Karpati, A., Parashar, U. D., Greene, K. D., Wells, J. G., Srivastava, A., Tauxe, R. V., Mintz, E. D., & Quick, R. (2000). Traveler's diarrhea at sea: three outbreaks of waterborne enterotoxigenic *Escherichia coli* on cruise ships. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(4), 1491–1495. <https://doi.org/10.1086/315397>

Egas Vivero, P. R. (2016). Caracterización fenotípica y genotípica del bacteriófago 5q18 activo contra *Escherichia coli* enteropatógena multirresistente. *Pontificia Universidad Católica Del Ecuador*.

Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 438–450. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>

Iman, T. H. (2021, July). *Infeción de la vejiga - Trastornos renales y del tracto urinario*. University of Riverside School of Medicine. <https://www.msmanuals.com/es-ec/hogar/trastornos-renales-y-del-tracto-urinario/infeciones-urinarias-iu/infeción-de-la-vejiga>

- INEC. (2018). *Instituto Nacional de Estadística y Censos – Ecuador*.
<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/institucional/#>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*.
Nature Reviews Microbiology 2004 2:2, 2(2), 123–140.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Lee, G. Y., Jang, H. I., Hwang, I. G., & Rhee, M. S. (2009). Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 196–200.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2009.06.013>
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 3–32. https://doi.org/10.1007/82_2012_303
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. D. (2019). Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3). https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18/SUPPL_FILE/CMR.00135-18-SD002.XLSX
- Monaghan, A., Byrne, B., Fanning, S., Sweeney, T., McDowell, D., & Bolton, D. J. (2013). Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), 595–603. <https://doi.org/10.1111/JAM.12064>
- Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J. P., & Trueba, G. (2021). Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing-*Escherichia coli* Isolated From Irrigation Waters and Produce in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.709418/FULL>
- Mueller, M., & Tainter, C. R. (2021). *Escherichia Coli*. *Encyclopedia of Microbiology*,

171–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02291-1>

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.142>

Oh, K. H., Kim, S. B., Park, M. S., & Cho, S. H. (2014a). Development of a one-step PCR assay with nine primer pairs for the detection of five diarrheogenic *Escherichia coli* types. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 862–868. <https://doi.org/10.4014/JMB.1312.12031>

Oh, K. H., Kim, S. B., Park, M. S., & Cho, S. H. (2014b). Development of a One-Step PCR Assay with Nine Primer Pairs for the Detection of Five Diarrheogenic *Escherichia coli* Types. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(6), 862–868. <https://doi.org/10.4014/JMB.1312.12031>

Olsvik, Ø., Wasteson, Y., Lund, A., & Hornes, E. (1991). Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *International Journal of Food Microbiology*, 12(1), 103–113. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90051-P](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90051-P)

Ordóñez Obando, I. E. (2015). *Sensibilidad antimicrobiana de escherichia coli en infecciones del tracto urinario en la atención primaria de salud. Comunidad Pascuales*. [Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/8149>

Rojas Silva, P. (2008). *Estudio de prevalencia y genotificación de Escherichia coli enterotoxigénica aislado en comunidades de Esmeraldas*.

Saka, H. K., Dabo, N. T., Muhammad, B., García-Soto, S., Ugarte-Ruiz, M., & Alvarez, J. (2019). Diarrheogenic *Escherichia coli* Pathotypes From Children Younger Than 5 Years in Kano State, Nigeria. *Frontiers in Public Health*, 7, 348. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2019.00348/BIBTEX>

Salazar-Llorente, E., Morales, M., Sornoza, I., Mariduena-Zavala, M. G., Gu, G.,

- Nou, X., Ortiz, J., Maldonado-Alvarado, P., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2021). Microbiological Quality of High-Demand Food from Three Major Cities in Ecuador. *Journal of Food Protection*, *84*(1), 128–138.
<https://doi.org/10.4315/JFP-20-271>
- Singh, P., Metgud, S. C., Roy, S., & Purwar, S. (2019). Evolution of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in India. *Journal of Laboratory Physicians*, *11*(4), 346. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_58_19
- Tanabe, R. H. S., Vieira, M. A., Mariano, N. A. B., Dias, R. C. B., da Silva, R. V., Castro, C. M., dos Santos, L. F., Camargo, C. H., Yamatogi, R. S., Rall, V. L. M., & Hernandes, R. T. (2019). Identification and characterization of atypical enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef and poultry breast purchased in Botucatu, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *50*(4), 1099. <https://doi.org/10.1007/S42770-019-00101-6>
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in Microbiology*, *8*(AUG), 1566. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01566>
- Truong, W. R., Hidayat, L., Bolaris, M. A., Nguyen, L., & Yamaki, J. (2021). The antibiogram: key considerations for its development and utilization. *JAC-Antimicrobial Resistance*, *3*(2). <https://doi.org/10.1093/JACAMR/DLAB060>
- Zurita, J., Yáñez, F., Sevillano, G., Ortega-Paredes, D., & Paz y Miño, A. (2020). Ready-to-eat street food: a potential source for dissemination of multidrug-resistant *Escherichia coli* epidemic clones in Quito, Ecuador. *Letters in Applied Microbiology*, *70*(3), 203–209. <https://doi.org/10.1111/LAM.13263>