

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE  
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



“CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* VEROTOXIGÉNICA  
EN PRODUCTOS VEGETALES COMERCIALIZADOS EN LOS PRINCIPALES  
MERCADOS DE IBARRA”

Trabajo de titulación previa a la obtención del título de  
Ingeniera en Biotecnología

AUTORA:  
MARCIA ALEJANDRA PINTO TEDÉS

DIRECTOR:

Pedro Miguel Barba Estrella MSc.

Ibarra – Ecuador

2020

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE  
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* VEROTOXIGÉNICA  
EN PRODUCTOS VEGETALES COMERCIALIZADOS EN LOS PRINCIPALES  
MERCADOS DE IBARRA”

Tesis de Grado revisada por el Comité Asesor; por lo cual, se autoriza su presentación  
como requisito parcial para obtener el Título de:  
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADA:  
PEDRO MIGUEL BARBA ESTRELLA MSc.  
DIRECTOR



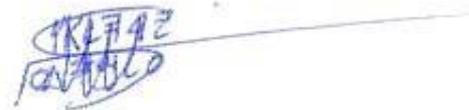
SANTIAGO ZARATE BACA MSc.  
ASESOR



CARLA ALEXANDRA SANDOVAL GUANO MSc.  
ASESORA



VALERIA OLMEDO GALARZA MSc.  
ASESORA





UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE  
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN FAVOR DE LA  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	100309972-6		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Pinto Tedés Marcia Alejandra		
<b>DIRECCIÓN:</b>	Ibarra – La Primavera, calle Bernardino Echeverría y Diana de Gales		
<b>EMAIL:</b>	mapintot@utn.edu.ec		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	2 610090	<b>TELÉFONO MÓVIL:</b>	0981912311

DATOS DE LA OBRA	
<b>TÍTULO:</b>	CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE <i>Escherichia coli</i> EN PRODUCTOS VEGETALES COMERCIALIZADOS EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE IBARRA
<b>AUTOR (ES):</b>	Pinto Tedés Marcia Alejandra
<b>FECHA: DD/MM/AAAA</b>	25/06/2020
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniera en Biotecnología
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	Barba Estrella Pedro Miguel

2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, 25 de junio del 2020.

EL AUTOR:

Nombre: Pinto Tedés Marcia Alejandra

### **3. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD**

Yo, **Marcia Alejandra Pinto Tedés**, con cédula de identidad Nro.**100309972-6**, en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

#### **4. CONSTANCIAS**

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros; por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, 25 de junio del 2020.

**LA AUTORA:**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Alejandra", with a large, stylized flourish that loops around the text.

Marcia Alejandra Pinto Tedés

## **DECLARACIÓN**

Yo **MARCIA ALEJANDRA PINTO TEDÉS** declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; y que éste no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual correspondiente a este trabajo, a la Universidad Técnica del Norte, según lo establecido por las leyes de propiedad intelectual, reglamentos y normatividad vigente de la Universidad Técnica del Norte.

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por el estudiante: **MARCIA ALEJANDRA PINTO TEDÉS**, bajo mi supervisión.



---

A handwritten signature in blue ink, reading "Pedro Miguel Barba Estrella", is positioned above a solid horizontal line. A second, slightly wavy horizontal line is drawn below the first line, also in blue ink.

**Pedro Miguel Barba Estrella MSc.  
DIRECTOR DEL PROYECTO**

## **PRESENTACIÓN**

Yo, MARCIA ALEJANDRA PINTO TEDÉS como autora de la Tesis Titulada **“CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* VEROTOXIGÉNICA EN PRODUCTOS VEGETALES COMERCIALIZADOS EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE IBARRA”**, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios, por permitirme llegar a culminar una etapa más en mi vida. Por brindarme la sabiduría y la fortaleza necesaria para afrontar cada reto con valentía y esfuerzo. Por enseñarme a valorar cada triunfo y apreciar cada momento de mi vida.*

*A mi madre, por ser una mujer ejemplar, responsable y llena de valores que me ha inculcado por el camino del bien y gracias a su inmenso cariño y amor ha hecho posible que esté cumpliendo cada una de mis metas. Por ser la persona que me ha acompañado durante toda esta trayectoria llena de sacrificios y logros. Mi madre, mi heroína, mi ejemplo a seguir y mi apoyo incondicional que ha llenado mi vida de alegría; este logro es especialmente para usted.*

*A mi querida tía Yolanda Tedés gracias por creer siempre en mí, y por estar en mis altos y bajos, gracias por demostrarme que tendré un apoyo incondicional y un cariño infinito que me supo brindar desde mi infancia.*

*A mi familia, que siempre me brindaron ese apoyo incondicional a pesar de las dificultades y siempre estuvieron a mi lado llenándome de cariño y protección.*

*Al MSc Pedro Barba, director de tesis, que con sus conocimientos y valiosa guía ha sabido guiarme en esta investigación, por lo cual estoy eternamente agradecida.*

*Al Dr. Ricardo Oropeza, profesor, amigo y guía de investigación que compartió conocimientos enseñándome que lo imposible solo está la mente, por ser paciente, creer en mí, enseñarme a confiar en mis resultados y por ser un gran ser humano.*

*A mi querido compañero Jordy Peñafiel gracias por estar a mi lado acompañándome, dando ánimos y siendo un soporte en mi vida, gracias por ayudarme con mi investigación y aportarme conocimientos.*

*A mis compañeros y amigos que siempre me alentaron a seguir adelante y a enfrentar mis miedos para dar siempre lo mejor de mí.*

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis está dedicada a mis abuelitos que ya no se encuentran a mi lado, pero que gracias a su inmenso cariño y sus enseñanzas aún siguen guiando mi camino; a mi papá Luis que siempre compartió a mi lado grandiosos momentos llenos de cariño y alegría, que me enseñó a ser fuerte y mantenerme siempre tranquila, a ser responsable y respetuosa con todos, por enseñarme a ser una mujer de bien, por ser un Padre ejemplar y por darme una niñez llena de alegrías; a mi mamá Delfina que con su maravillosa forma de ser me enseñó a ser una mejor persona y siempre tener una gran sonrisa y un buen corazón, por enseñarme a perseguir mis sueños sean cuales sean y siempre tratar de cumplir cada uno, por enseñarme que lo más hermoso de una persona es la bondad y la humildad, por brindarme consejos que son valiosos en mi vida.*

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>XVI</b>
RESUMEN .....	XVII
ABSTRACT .....	XVIII
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
1. Revisión Literaria .....	3
1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	3
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógeno (EPEC) .....	5
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo (EIEC) .....	6
1.2.3 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativo (EAEC) .....	6
1.2.4 <i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa (DAEC).....	6
1.2.5 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	7
1.2.6 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico (EHEC).....	7
1.3 Formación de Biopelículas .....	10
1.4 <i>Escherichia coli</i> en América Latina .....	11
1.5 Alimentos implicados .....	13
1.6 <i>Escherichia coli</i> en vegetales .....	14
1.7 Vegetales de Estudio .....	15
1.7.1 <i>Apium graveolens</i> . .....	15
1.7.2 <i>Coriandrum sativum</i> . .....	15
1.7.3 <i>Lactuca sativa</i> . .....	16
1.7.4 <i>Petroselinum crispum</i> . .....	16
1.7.5 <i>Capsicum annum</i> . .....	16
1.7.6 <i>Solanum lycopersicum</i> . .....	16
1.8. Metodología para la Identificación de microorganismos .....	17
1.8.1 MALDI-TOF (Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) .....	17
1.9 Tipificación para y análisis de clonalidad de cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	17
1.9.1 BOX-A1R.....	17
1.10 Marco legal.....	18
1.10.1 Constitución del Ecuador.....	18
1.10.2 Ley Orgánica de Salud. ....	19
1.11 Problema.....	21

1.12 Justificación .....	21
1.13 Pregunta directriz de la investigación.....	23
1.14 Objetivos.....	23
1.14.1 Objetivo general. ....	23
1.14.2 Objetivos específicos.....	23
1.15 Hipótesis .....	23
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>24</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>24</b>
2.1 Área de Estudio. ....	24
2.2 Recolección de Muestras Vegetales .....	25
2.3 Procesamiento de las muestras .....	25
2.4 Aislamiento de cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	26
2.5 Identificación de especie mediante MALDI-TOF.....	26
2.6 Crío-preservación de los aislados .....	26
2.7 Extracción de ADN .....	26
2.8 Identificación molecular de <i>Escherichia coli</i> verotoxigénica y otros patotipos... 27	
2.8.1 Reacción en cadena polimerasa.....	28
2.10.1 Electroforesis de la amplificación de los genes de virulencia.....	29
2.11 Biopelículas .....	29
2.12 Tipificación para análisis de clonalidad de cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	30
2.12.1 PCR palindrómica extragénica repetitiva basada en BOX-A1R.....	30
2.12.2 Electroforesis del producto de BOX-PCR.....	31
2.12.3. Análisis del producto de BOX-PCR.....	31
2.13 Elaboración del Protocolo de Vigilancia Epidemiológica cepa O157:H7 .....	31
2.14 Análisis estadístico .....	32
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>33</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>33</b>
3.1 Número de Unidades Formadoras de Colonias .....	33
3.2 Aislamiento e Identificación de Aislados .....	34
3.3 Identificación de Genes de Virulencia de <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.4 Amplificación del gen <i>astA</i> .....	36
3.4.1 Secuenciación del gen <i>astA</i> . ....	36
3.5 Amplificación del gen <i>fliC</i> .....	37
3.6 Formación de Biopelículas .....	37
3.7 Técnica de Tipificación para analizar la clonalidad de cepas de <i>Escherichia coli</i> 38	
3.7.1 BOX – PCR de cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	38
3.7.2 Construcción del Dendrograma UPGMA y análisis de clonalidad. ....	38
3.8 Elaboración del Protocolo de Vigilancia Epidemiológica.....	39

<b>CAPITULO IV</b> .....	<b>40</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>48</b>
<b>Conclusiones y Recomendaciones</b> .....	<b>48</b>
5.1 Conclusiones.....	48
5.2 Recomendaciones .....	48
Bibliografía.....	51
Anexos.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Brotos causados por diferentes patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	11
Tabla 2.- Patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	11
Tabla 3.- Intoxicaciones alimentarias causadas por patógenos no identificados en el Ecuador 2018.....	13
Tabla 4.- Infecciones a nivel mundial causadas por consumir vegetales contaminados	14
Tabla 5.- Taxonomía de los vegetales de estudio .....	16
Tabla 6.- Genes de virulencia para la identificación de los patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	27
Tabla 7.- Programación de PCR para los genes de estudio .....	29
Tabla 8.- Programación de PCR para el análisis de clonalidad mediante BOX-A1R... 30	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presencia de diferentes patotipos de <i>E. coli</i> en países de América Latina .....	12
Figura 2. Mapa de la ubicación de los Principales Mercados de Ibarra-Imbabura. ....	24
Figura 3. Diagrama de proceso de extracción de ADN de <i>Escherichia coli</i> . ....	26
Figura 4. Descripción de la placa de lisa. (96 pocillos). ....	29
Figura 5. Mediana de las unidades formadoras de colonia presentes en las muestras de los mercados en estudio. ....	33
Figura 6. Mediana de las unidades formadoras de colonias presentes en los vegetales de estudio. ....	33
Figura 7. Identificación de bacteriana presentes en los mercados mediante Maldi-Tof. ....	34
Figura 8. Identificación de microorganismos en vegetales mediante Maldi-Tof. ....	34
Figura 9. Presencia de genes de virulencia en los mercados de estudio. ....	35
Figura 10. Vegetales de estudio que tienen presencia de los genes de virulencia. ....	35
Figura 11. Amplificación del gen <i>astA</i> . ....	36
Figura 12. Confirmación de la presencia del gen <i>astA</i> . ....	36
Figura 13. Amplificación del gen <i>fliC_F</i> . ....	37
Figura 14.- Amplificación de bandas de <i>Escherichia coli</i> en gel de agarosa. ....	38
Figura 15.- Análisis de conglomerados de huellas digitales de <i>Escherichia coli</i> . ....	38
Figura 16. Biopelículas de cepas de <i>Escherichia coli</i> . ....	39

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.-Mapa del mercado Amazonas de la ciudad de Ibarra.....	69
Anexo 2.- Mapa del mercado Santo Domingo de la ciudad de Ibarra.....	69
Anexo 3.- Mapa del mercado Mayorista de la ciudad de Ibarra.....	69
Anexo 4.-Medios usados para aislar <i>Escherichia coli</i> .....	70
Anexo 5.-Etiqueta para reconocimiento de cajas petri .....	70
Anexo 6.-Caja Petri etiquetada.....	70
Anexo 7.-Protocolo.....	71

## RESUMEN

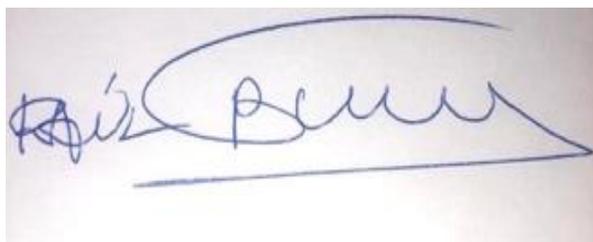
Los vegetales son ampliamente recomendados por su alto contenido de vitaminas, minerales, fibra y energía. Uno de los principales riesgos de infección por su consumo, es la contaminación por microorganismos con potencial patógeno. *Escherichia coli* es una bacteria que advierte sobre contaminación en alimentos producto de una mala manipulación o un riego inadecuado en los cultivos vegetales especialmente en hortalizas. Además de ser un microorganismo comensal que forma parte de la microbiota del ser humano y está presente en animales de sangre caliente, se lo reconoce como patógeno oportunista que puede provocar infecciones intra y extra intestinales. Uno de los patotipos con potencial patogénico es *Escherichia coli* verotoxigénica, que posee flexibilidad genética que le permite estar en constante evolución desarrollando diferentes mecanismos de virulencia. Dentro de este grupo de cepas se encuentra la O157:H7, la cual puede generar complicaciones gastrointestinales y poner en riesgo la salud humana. En la región no existen estudios que identifiquen la presencia de la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 en vegetales. Por tal motivo el objetivo de esta investigación es determinar la ocurrencia de *E. coli* verotoxigénica en vegetales comercializados en Ibarra. Se realizó un muestreo probabilístico por triplicado en los principales mercados de Ibarra durante 3 semanas consecutivas, en el cual se tomó muestras de 6 diferentes vegetales de habitual consumo sin cocción. Se aislaron colonias con morfología típica de *Escherichia coli* utilizando medio MacConkey; la confirmación de especie se realizó mediante MALDI-TOF. Se realizó la identificación de cepas verotoxigénicas mediante detección molecular por PCR. Se estudió la relación clonal de las cepas aisladas mediante BOX-PCR. Se analizaron un total de 64 muestras vegetales y se obtuvo 180 aislados de los cuales y 29 aislados fueron confirmados como *Escherichia coli*. En la identificación del serotipo verotoxigénico, 8 aislados presentaron el gen *fliC\_F* y ninguno presento el gen *rfbE\_R*, confirmando la ausencia de *E. coli* verotoxigénica en las muestras estudiadas. Se propuso, además, un protocolo de vigilancia epidemiológica. Los datos aquí presentados sirven de base para futuras investigaciones, realizando estudios más exhaustivos con el fin de determinar la prevalencia de diferentes patotipos de *E. coli* en vegetales comercializados en Ibarra.

**PALABRAS CLAVES:** *Escherichia coli*, vegetales, cepa verotoxigénica, Ibarra

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is used as a microorganism in modern biotechnology that produce therapeutic proteins due to its high rate of growth and easy-to-use. Besides, this bacterium is a marker for pollution in food as a result of wrong manipulation or inadequate watering in harvests, especially in vegetable. Vegetables are widely recommended because of their high content of vitamins, minerals, fiber and energy. One of the leading infection risks for consuming raw vegetables is the contamination with pathogen microorganisms, since there are *Escherichia coli* strains considered as opportunist pathogens. When this pathogen is consumed, they are part of the bowel and they belong to the human and animal microbiota, whose will turn into reservoirs and disseminators. Pollution generated in harvests has brought new strains. *Escherichia coli* is in constant evolution, horizontal gene transfer has caused the development of different virulence mechanisms, thanks to its genetic flexibility. Verotoxigenic O157:H7 *E. coli* is an important strain for research because of its virulence traits, it can cause gastrointestinal illness and get in risk human life. In this region of the country, there are no research identifying the presence of verotoxigenic *Escherichia coli* in vegetables. Thus, this investigation is to determine the occurrence of verotoxigenic *E. coli* in vegetables commercialized in Ibarra city. Six raw common-use vegetable samples were taken from the main markets in Ibarra city. *E. coli* strains were isolated from vegetable products using MacConkey medium. Identification was made for verotoxigenic *E. coli* and Shiga-like toxin, through molecular methods. Clonal relation was studied for the isolated strains. Finally, the strains were used for didactic or research purposes.

Keywords: *Escherichia coli*, Vegetables, Veratoxigenic strain, Ibarra.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rafael Benito', written over a horizontal line.

# CAPÍTULO I

## Introducción

*Escherichia coli* es un miembro importante de la microbiota intestinal que cumple con el rol de suprimir el crecimiento de otras bacterias patógenas; sin embargo, en la actualidad es considerada como una de las principales bacterias de mayor preocupación alimentaria y se le cataloga como un agente epidemiológico (León, 2005). *Escherichia coli* abarca diversos grupos de patógenos alimentarios emergentes que han sido implicados en numerosos brotes a nivel mundial, que pueden extenderse entre regiones, causando principalmente infecciones gastrointestinales que están acompañadas de fiebre, vómito y, en casos más severos, el síndrome urémico hemolítico (Mattar, Visbal, et al., 2001).

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un problema grave para la salud pública a nivel mundial ya que son una de las causas importantes en la reducción del crecimiento económico (Muñoz, 2017). La Organización Mundial de la Salud estima que 420 mil personas mueren al año por ingerir alimentos contaminados como carne, agua, verduras, frutas, productos lácteos; las enfermedades diarreicas ocupan más de la mitad de las cifras provocando 550 millones de personas afectadas, de las cuales 230 mil mueren cada año. (OMS, 2015).

Las enfermedades diarreicas causadas por agentes patógenos son unas de las principales causas de morbilidad y mortalidad especialmente en niños menores de 5 años que han ingerido alimentos contaminados (Villalobos, 2008). Actualmente los brotes causados por *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) se relaciona con el consumo de frutas, hortalizas y carnes (Solomon et al., 2002).

La presencia de bacterias patógenas en el ambiente hace que los alimentos que se producen y procesan puedan sufrir contaminación cruzada y ocasionar infecciones gastrointestinales. (Boyce et al., 2000). Por otro lado, la posibilidad de contaminación por microorganismos en hortalizas es elevada, ya que en la superficie donde crecen puede existir fuentes de dispersión como agua de riego contaminado y abono orgánico no

tratado, que puede facilitar la adhesión y colonización de microorganismos (Torres-Aguilar et al., 2015).

Según una investigación presentada en la Reunión Anual de la Sociedad de Microbiología, se detalló que *Escherichia coli* hemorrágica interactúa directamente con las células de las plantas mediante la internalización (capacidad de las bacterias para penetrar los tejidos internos), usa los flagelos que le permite adherirse y penetrar las paredes celulares de la planta para colonizarla completamente e interactuar directamente con las moléculas de lípidos que se encuentran en las membranas, esto transcurre en un lapso de 10 días (Wright et al., 2017).

La OMS estima que el 10% de la población mundial ingiere alimentos contaminados con aguas residuales y que el 4% de las muertes en todo el mundo están relacionadas con la calidad del agua y se lo considera un portador de un gran número de agentes patógenos (Food and Drug Administration, 1997; y García et al., 2017). En América Latina, África y Asia la causa principal de las enfermedades diarreicas agudas son causadas por el manejo inadecuado de aguas residuales y se estima que cada año mueren alrededor de 3,3 millones de niños menores de 5 años debido a infecciones producidas por bacterias (García et al., 2017; y Ramírez, 2001).

*Escherichia coli* enterohemorrágica es uno de los patógenos emergentes a nivel mundial y es un patotipo de estudio importante ya que es responsable principal de brotes asociados con el consumo de alimentos contaminados, estimando que el 10% de los casos esporádicos presentan cuadros clínicos graves y desarrollan el síndrome urémico hemolítico, con una tasa de letalidad del 5% (Phillips et al., 2000).

## **1. Revisión Literaria**

### **1.1. Familia Enterobacteriaceae**

La familia Enterobacteriaceae está constituida por diversas bacterias Gram-negativas, entre ellas se encuentran desde simbioses no perjudiciales hasta especies patógenas como: *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Klebsiella* sp, *Escherichia coli*, entre otras (Algorta, 2014). Estas especies pueden causar diferentes tipos de enfermedades en el organismo tales como: infecciones en el torrente sanguíneo, infecciones respiratorias y de forma más común infecciones gastrointestinales, esto se debe a que habitualmente se alojan en el tracto digestivo donde compiten con la microbiota intestinal (Rodríguez, 2010).

Las Enterobacterias son un grupo grande y heterogéneo que contienen más de 30 géneros y más de 100 especies. La mayor parte presentan plásmidos que le brindan ventaja adaptativa, presentan una forma bacilar de 1 a 3µm de largo; pueden ser: aerobios, anaerobios, fermentadores de lactosa y glucosa, entre otros. La presencia de este tipo de microorganismo en alimentos, productos procesados y aguas de riego advierten una posible contaminación y son considerados indicadores de calidad (Cajas et al., 2015; y Rivas et al., 1863).

### **1.2 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un patógeno oportunista que fue descrito por Theodore Von Escherich en 1885. Es fermentador de lactosa, aerobio facultativo y se caracteriza por ser un coliforme termotolerante. Generalmente, se localiza en el intestino grueso de mamíferos incluyendo el ser humano (Grant et al., 2008). Los reservorios más comunes son: el tracto digestivo de animales (bovinos, borregos, cerdos, venados, perros y aves) productos lácteos, jugos no pasteurizados, carne cruda o media cocida y hortalizas (lechuga, tomate, apio, culantro, pimiento, espinaca, perejil, entre otros) (FAO, 2011).

Esta bacteria es capaz de colonizar el tracto digestivo sin causar ninguna enfermedad, pero existen cepas que han desarrollado la capacidad de producir factores de virulencia, llegando a colonizar ambientes extra-intestinales (Lobos, 2013). Los cuadros patológicos causados por los diversos patotipos de *Escherichia coli* van desde diarrea acuosa leve acompañada de fiebre y vómito hasta diarrea con sangre conocido como síndrome urémico hemolítico (Astrith et al., 2013; y FAO, 2011 ).

La intoxicación alimentaria causada por organismos infecciosos que producen toxinas de tipo “vero” ha incrementado, como es el caso de *Escherichia coli*. Posee un genoma muy plástico que le permite adquirir nuevos factores de virulencia mediante la transferencia horizontal de genes. (SEBI, 2017)

La información genética demuestra que posee plásmidos, los cuales se diseminan muy fácilmente entre cepas adquiriendo nuevos genes. Se han descrito más de 300 tipos de plásmidos que pertenecen a *E. coli*. Se ha demostrado que gran parte de su cromosoma posee bacteriófagos, los cuales están íntimamente relacionados con los factores de virulencia (Colomer et al., 2011; y Souza et al., 2001).

En 1990 se desarrolla un esquema de serotipos que varía continuamente, de los cuales se conoció que *Escherichia coli*, serológicamente, posee 3 tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y capsular (K), logrando identificar más de 700 serotipos de los cuales: 187 pertenecen al antígeno O, 75 al H y 103 al K, creando diferentes combinaciones e identificando los diferentes patotipos (Carmona, 1997).

El antígeno somático O es un polisacárido de unidad de repetición importante, está presente en la membrana exterior (lipopolisacárido), posee una región interna conformada por lípidos, una región intermedia formada por oligosacáridos y una región externa de polisacáridos lo cual ejerce una resistencia bacteriana (Carmona, 1997; y Samuel; et al., 2006).

El antígeno flagelar H está compuesto por la proteína flagelina que se encarga de la movilidad de la bacteria (el flagelo), está constituida por la subunidad del filamento helicoidal que se encarga de la motilidad celular bacteriana (Wang et al., 2006).

El antígeno capsular K es un glucopolisacárido que confiere resistencia bacteriana hacia el suero sanguíneo y la fagocitosis, sin embargo, uno de los serotipos más estudiados es K1 se lo asocia especialmente con meningitis neonatal, bacteriemia y septicemia (Kaczmarek et al., 2014; y Morales et al., 2017).

En la actualidad se ha descrito 6 principales patotipos de *Escherichia coli* que son: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) y *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) (Rivas et al., 2007.). Actualmente *Escherichia coli* y los diferentes patotipos descritos se han convertido en agentes infecciosos potenciales y se les cataloga como principales patógenos infecciosos que causan diversas epidemias tanto en animales como en el ser humano (León, 2005). El serotipo de *E. coli* O157:H7 fue el primero en relacionarse con casos esporádicos de diarrea hemolítica y diversos estudios han comprobado que ciertos serogrupos pueden causar enfermedades humanas tales como los O45, O103, O111, O121 y O145 (Gomes et al., 2016).

**1.2.1 *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC).** Es uno de los primeros patotipos identificados serológicamente que se lo asocia principalmente con casos de diarrea infantil en niños menores de dos años, siendo una de las causas de mayor morbilidad y mortalidad en países no industrializados (González, 2011). La diarrea causada por este tipo de cepas pueden tener diversos grados de intensidad que puede estar acompañado de vómito y fiebre, y su periodo de incubación después de ingerir es de 3 a 24 horas (Vidal y Gutiérrez, 2007).

El mecanismo de infección que utiliza este patotipo se caracteriza por el efecto “adhesión/borrado” iniciando su inoculación en la parte externa del intestino, provocando una rotura en la superficie celular y degeneración de las microvellosidades, esto se asocia con la isla de patogenicidad LEE y al gen *eae*, que es el principal factor de la adherencia de la bacteria con los enterocitos y la destrucción de microvellosidades (Sanchez, 2018). El sistema inmune reacciona con una respuesta inflamatoria aguda en el intestino delgado, provocando un adelgazamiento de la mucosa intestinal, conjuntamente con la secreción de electrolitos que provocan cambios fisiológicos responsables de la diarrea acuosa (Castillo, 2015).

Se ha demostrado que los principales reservorios de este patotipo son los alimentos, y se cree también que el aire, a través de la formación de aerosoles, que pueden estar involucrado con la diseminación de la bacteria. Además se encuentran en animales como: ganado y aves silvestres, que funcionan como vectores para su diseminación (Vidal, 2003).

**1.2.2 *Escherichia coli* enteroinvasivo (EIEC).** Fue reconocido en 1971, tiene la capacidad de invadir las células del epitelio intestinal. Primero se adhiere a las vellosidades de la mucosa y entra por endocitosis a la célula para una breve multiplicación y después ataca a la mucosa del colón provocando colitis inflamatoria invasiva acompañada de fiebre, calambres abdominales, diarrea con sangre y moco, y en algunos casos pueden terminar con disentería (Kaper et al., 2004).

El mecanismo invasor que posee es idéntico al de *Shigella* sp. ya que evolucionaron del mismo antepasado y forman un solo patovar. EIEC expresa el mismo gen del antígeno plasmídico de invasión H (*ipaH*) que está presente en *Shigella* sp.; sin embargo, posee otros genes de invasión que se encuentran en el plásmido de virulencia pINV (Rodríguez, 2002).

**1.2.3 *Escherichia coli* enteroagregativo (EAEC).** Este patotipo se describió por primera vez en 1987, principalmente infecta a niños causándole diarrea aguda y persistente. EAEC tiene más resistencia a los antibióticos. Estudios realizados en murinos han descrito que una proteína (dispersina) modula la adhesión fimbrial facilitando la penetración a la mucosa intestinal, coloniza y produce efectos citotóxicos que provocan diarrea acuosa sin fiebre (Okhuysen y DuPont, 2010).

El principal factor de virulencia es el patrón de adherencia-agregativa (A/A) observado en las líneas células HEP-2 y HeLa. Además, tienen plásmidos que codifican factores de virulencia e incluyen un regulador AggR (activadores transcripcionales bacterianos), que activan varios genes de virulencia (García et al., 2014; y Morin et al., 2013).

**1.2.4 *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC).** La primera cepa fue aislada en 1984, aún no se desconoce el mecanismo y el factor de virulencia que utiliza este patotipo, sin embargo, estudios morfológicos han demostrado que estas cepas se unen a la mucosa intestinal mediante adhesinas (afimbriales y fimbriales) que interactúan con las microvellosidades del intestino delgado y no producen ningún tipo de toxinas, pero crean un efecto citopático, que puede generar o no diarrea (Carmona, 1997; Riveros et al., 2011; y Sanchez, 2018).

**1.2.5 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).** ETEC conocida también como “diarrea del viajero”, su mecanismo de infección es la adherencia a la mucosa del intestino delgado por medio de pili o fimbrias, fabrica enterotoxinas termolábiles (TL) y termoestable (ST) que se encuentran codificadas dentro de un plásmido o de transposones. A medida que el nivel de enterotoxinas aumenta provoca la inhibición de absorción de iones de sodio y la estimulación de la secreción de cloruro causando diarrea acuosa, puede ir acompañado de fiebre y vómito, existe muy poca inflamación que se la conoce como “Infección no inflamatoria del intestino delgado” (Algorta, 2014; y Rodríguez, 2002).

**1.2.6 *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC).** En 1975 se realizó el primer aislamiento de la cepa patógena O157:H7 en una muestra de heces obtenida de un paciente con diarrea sanguinolenta (Pérez y Villalobos, 2016). En 1982 se produjo un brote en pacientes que presentaron colitis-hemorrágica en el cual se reportaron 26 casos en el Estado de Oregón, Estados Unidos, y tres meses después ocurrieron 21 casos en el Estado de Michigan, llegando a determinar que los brotes fueron causados por el consumo de hamburguesas poco cocidas (Nataro y Kaper, 1998). La contaminación por EHEC puede ocurrir durante el procesamiento, la distribución y manipulación de los alimentos (Zou et al., 2014).

La primera cepa de *Escherichia coli* patógena productora de la toxina *Shiga like* (STEC) fue descrita por primera vez en 1977 por Konowalkchuck et al., quien junto con su equipo de investigación demostró que era capaz de producir una toxina a la que se la denominó verotoxina (Konowalchuk et al., 1977). Existen dos grupos principales de verotoxinas (Vt1, Vt2) y STEC puede producir ambos tipos de verotoxinas (Institute for International Cooperation Animal Biologics, 2010). En 1980 se logra identificar que *E. coli* puede expresar genes de *Shigella* sp. (Stx1 y Stx2) y surge la idea de una “cepa mutante”, originada por un bacteriófago que puede causar enfermedades diarreicas; la cepa encontrada presentó antígenos O y H, y fue reconocida como: O157:H7 (Nataro y Kaper, 1998). Se ha demostrado que la toxina Stx2 tiene mayor actividad citotóxica que Stx1 y presentan mayor riesgo de desarrollar diarrea sanguinolenta (Rivas et al., 2008.)

Las condiciones óptimas de supervivencia y crecimiento de EHEC influyen: temperatura, pH, agua y alcalinidad (FAO/OMS, 2004). Se ha demostrado que la temperatura óptima para el crecimiento de O157:H7 dentro de un laboratorio es de 37° C, no sobrevive a temperaturas mayores que los 47°C, y sobrevive el proceso de congelación (Doyle, 1991). En el medio externo puede sobrevivir aproximadamente de 42 a 49 días y producir toxinas a una temperatura de 37°C y a una temperatura de 45°C puede vivir por 63 a 70 días (Mattar, et al., 2001).

**1.2.6.1 características de EHEC.** Según (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, 2011; Torres-Aguilar et al., 2015) el patotipo EHEC presenta las siguientes características:

- No fermenta sorbitol.
- No posee actividad de  $\beta$ -glucoranidasa.
- La temperatura óptima de crecimiento varía entre los 30°C – 42°C.
- Sobrevive a temperaturas de -20°C
- Posee resistencia a los cambios de pH (4.4).
- Posee un antígeno flagelar H7.
- Dosis infecciosa de menos de 15 células.
- Posee varios factores de virulencia como: la Isla de Patogenicidad (PAI), el locus de eliminación del enterocito (LEE), adhesinas, intimina, chaperones, un sistema de secreción tipo III y varias proteínas secretadas como Tir.

**1.2.6.2 vías de transmisión EHEC.** La infección por EHEC generalmente se produce por el consumo de carnes poco cocidas, alimentos contaminado como vegetales y frutas; contagio de persona-persona que generalmente se produce en centros médicos y otro factor de riesgo pueden ser las granjas donde el humano entra en contacto directo con los animales (OMS, 2018; Rojas, 2018; y Reporte Técnico de Vigilancia, 2006).

**1.2.6.3 periodo de incubación EHEC.** El período de incubación después de ingerir los alimentos contaminados con EHEC puede variar entre tres a ocho días (OMS, 2018).

**1.2.6.4 cuadros clínicos EHEC.** Los síntomas provocados por EHEC empiezan con calambres abdominales que pueden ir acompañado de fiebre y vómito que pueden ser controlados a tiempo. Si el paciente no es atendido su cuadro puede empeorar produciendo una enfermedad mortal conocida como el síndrome urémico hemolítico. Se caracteriza por presentar complicaciones como trombocitopenia (disminución de la cantidad de plaquetas), anemia hemolítica (disminución de la masa de glóbulos) insuficiencia renal aguda (los riñones dejan de funcionar), hasta llegar a la muerte (FDA, 2019; OMS, 2018)

**1.2.6.5 factores de virulencia de *Escherichia coli* O157:H7.** El principal factor de virulencia de *Escherichia coli* O157:H7 es la producción de las toxinas adquiridas de *Shigella* y denominadas *Shiga-like* (Stx), las cuales se dividen en dos tipos que son: Stx1 y Stx2 y estos a su vez se subdividen en subtipos que son: Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2f, Stx2g, siendo, Stx1a, Stx2a y Stx2d los genes que se asocian con los casos más severos (Scheutz et al., 2012). Stx se localiza dentro de un bacteriófago e inhibe la síntesis de proteínas, producen la muerte celular mediante la eliminación del residuo de adenina del ribosoma 60s que impide la unión del ARN de transferencia al ribosoma.(Gomes et al., 2016).

Las toxinas Stx se trasladan del intestino al torrente sanguíneo, pasan por el riñón causando daños en las células glomerulares que alteran los filtros de las células del riñón ocasionando el síndrome urémico hemolítico (SUH) (Mattar, Visbal, et al., 2001).

Otro factor asociado a la virulencia es la proteína Intimina, su extremo C-terminal es responsable de la unión a las células epiteliales causando lesiones de “adhesión/borrado”. Esta proteína esta codificada por el gen *eae*, el cual forma parte de la isla de patogenicidad PAI que codifica varios factores de virulencia, necesarios para llevar a cabo lesiones de “adhesión/borrado” de los enterocitos (Blanco et al., 2004; y Montero et al., 2019). Se han identificado 14 variedades del gen *eae* que codifican 14 tipos y subtipos intiminales ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\theta$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ) (Blanco et al., 2004). Las cepas que expresan intimina tipo  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  se adhieren al intestino delgado, mientras que las de tipo  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  se unen al colon (Varela et al., 2008).

Esta cepa coloniza la superficie de la mucosa intestinal causando lesiones en la pared del enterocito, consecutivamente coloniza el colón con la toxina *Shiga-like* provocando una alteración en la barrera epitelial y en el transporte de iones que es provocado por la producción de la proteína Intimina codificada por el gen *eae* y posteriormente libera las verotoxinas (Margall 1997; y Montero et al., 2019). Por otra parte, puede llegar al torrente sanguíneo atacar a los glóbulos blancos provocando una respuesta inflamatoria; también pueden adherirse a los enterocitos por la presencia de un plásmido que codifica fimbrina (adhesina inicial) que borra las microvellosidades (Castillo, 2015; y Margall, 1997). Generalmente los síntomas empiezan con un dolor abdominal y cólicos, posteriormente se produce la diarrea con sangre que debe ser tratada con urgencia.

Otro factor de virulencia es la hemolisina codificada por el gen *ehxA*, ubicada en un plásmido enterohemorrágico; se ha identificado la existencia de 6 subtipos (A-F). Este gen provoca hemólisis y está asociado comúnmente a enfermedades diarreicas y el síndrome urémico hemolítico (Lorenz et al., 2013; y Pérez et al., 2016).

### **1.3 Formación de Biopelículas**

Un factor de virulencia usado por *E. coli* es la formación de biopelículas que se define como una comunidad de microorganismos que se encuentra adheridos a una superficie biótica (células epiteliales, piel humana y tejidos) o abiótica (metal, vidrio, implantes médicos, entre otras). Se desarrollan en diferentes etapas donde secretan sustancias protectoras. Durante la formación del biofilm las bacterias se comunican a través de una vía de señalización llamada *quórum sensing* (QS); durante éste, se segrega sustancias auto-inductoras que ayudan a las bacterias a formar el biofilm y secretar factores de virulencia (Naves, 2010; y Sharma et al., 2016).

Los biofilms pueden desarrollarse en cualquier ambiente que posea nutrientes adecuados, la primera fase es la adhesión en la cual la bacteria interactúa con la superficie del sustrato, la segunda fase es la fijación de las bacterias al sustrato, la tercera fase es la maduración donde coloniza el sustrato formando micro-colonias, la cuarta fase es la disgregación en el cual se crea ambientes heterogéneos (Lindsay y et al., 2006; y Naves, 2010).

## 1.4 *Escherichia coli* en América Latina

*Escherichia coli* es un agente etiológico que se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, tanto en países industrializados como los que están en vías de desarrollo (Villalobos, 2008). En la Tabla 1 se muestra los brotes causados por los diferentes patotipos en América.

Tabla 1.

*Brotes causados por diferentes patotipos de Escherichia coli en niños menores de 5.*

País	Paciente	Nº muestra	EPEC	ETEC	DAEC	EAEC	EIEC	EHEC (STEC)
Perú	Con diarrea	4223	8.5	6.9	4.8	9.9	0.6	0.8
	Sin diarrea	3760	10.9	4.7	2.3	10.4	0.6	0.5
Brasil	Con diarrea	1020	10	3.7	0	11.1	08.5	0.5
	Sin diarrea	187	5.9	3.2	0	8.6	0	1.1
Argentina	Con diarrea	112	6.2	8.9	0	8.9	6.2	6.2
México	Con diarrea	174	2.9	8.6	0	0	1.7	12
	Sin diarrea	30	0	0.6	0	0	0	0

*Fuente: (Sanchez, 2018).*

Diferentes estudios han demostrado que esta especie posee una fuerte estructura clonal; es un organismo muy diverso que posee un genoma dinámico. Puede dispersarse de manera epidémica, causando diversos brotes infecciosos (Tabla 2), esto se debe a que *E. coli* ha obtenido genes de otros linajes bacterianos mediante transferencia horizontal logrando que su género incluya diversos patotipos (Sanchez, 2018; Souza et al., 2001).

Figura 1.

Tabla 2.-

*Patotipos de Escherichia coli.*

Patotipo	Síntomas	Epidemiología
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito y fiebre baja	Niños menores de 6 meses y hasta 2 años.
EHEC (STEC)	Diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre y vomito	Niños y adultos.
EIEC	Diarrea con mucosidad, sangre o diarrea acuosa	Niños menores de 5 años.
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de 5 años.
EAEC	Diarrea líquida con moco sin sangre	Recién nacidos y niños menores de 2 años.
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años

*Fuente: (Díaz et al., 2014)*



Figura 1. Presencia de diferentes patotipos de *Escherichia coli* en países de América Latina (Torres, 2017).

En el Ecuador, según los últimos datos presentados por el Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica (SIVE, 2018) del Ministerio de Salud Pública y publicada en la Gaceta Epidemiológica N° 27, no se han identificado brotes causados por *Escherichia coli* durante el 2016 y 2018; sin embargo, existe información sobre enfermedades transmitidas por alimentos. Tabla 3. En el 2018 se notificó un total de 12.115 casos de intoxicaciones alimentarias a nivel Nacional (Bastidas, 2018; y Ministerio de Salud Pública, 2018).

Tabla 3.

*Intoxicaciones alimentarias causadas por patógenos no identificados en el Ecuador 2018.*

<b>Casos de Intoxicación alimentaria, por provincia, semanas epidemiológicas 1-52, año 2018</b>			
<b>Provincia</b>	<b>SE 1 – 51</b>	<b>SE 52</b>	<b>Total</b>
<i>Pichincha</i>	3.981	88	4.069
<i>Guayas</i>	2.488	16	2.504
<i>Tungurahua</i>	1.668	3	1.671
<i>Manabí</i>	942	25	967
<i>Esmeraldas</i>	775	13	778
<i>Imbabura</i>	684	13	697
<i>Chimborazo</i>	667	5	672
<i>Orellana</i>	569	11	580
<i>El Oro</i>	535	21	556
<i>Carchi</i>	426	1	427
<i>Napo</i>	389	8	397
<i>Azuay</i>	388	2	390
<i>Loja</i>	257		257
<i>Pastaza</i>	249	1	250
<i>Cotopaxi</i>	244	2	246
<i>Santo Domingo</i>	177	5	182
<i>Cañar</i>	141	3	144
<i>Morona Santiago</i>	132	4	136
<i>Los Ríos</i>	132	1	133
<i>Sucumbíos</i>	120		120
<i>Bolívar</i>	66		66
<i>Galápagos</i>	63		63
<i>Santa Elena</i>	54		54
<i>Zamora</i>	15		15
<i>Chinchipec</i>			
<i>Zona no delimitada</i>	3		3
<i>Total</i>	15.165	222	15.387

*Fuente: (Ministerio de Salud Pública, 2018).*

### **1.5 Alimentos implicados**

El principal reservorio de EHEC es el tracto intestinal del ser humano y animales de sangre caliente. Por otra parte, los alimentos también son una fuente principal para la propagación de estas cepas, los más implicados son: Vegetales (apio, lechuga, tomate, pimiento, culantro, perejil), Carnes (bovinos, equinos, caprinos), Productos enlatados o fermentados (jugos de manzana y embutidos), Productos lácteos (queso, manteca, leche) (Vilte, 2015).

## 1.6 *Escherichia coli* en vegetales

El consumo de vegetales es primordial para la salud humana, contiene altas propiedades alimenticias (minerales, vitaminas, energía, entre otros) (García et al., 2002). Anualmente se producen 450 millones de toneladas de vegetales, aumentando su consumo; sin embargo, algunos de estos productos están expuestos a la contaminación biológica y química, lo que genera un riesgo para la salud de los humanos (Muñoz, 2017).

La contaminación química puede ocurrir principalmente a través de la raíz, debido a que la mayoría de los vegetales son plantas rastreras que absorben los diferentes sustratos del suelo, lo cual sugiere que la mayoría de los casos de contaminación se da antes de la cosecha Wachtel et al., (2002).

La contaminación biológica se puede dar por medio de las fuentes de riego contaminados, estiércol usado como abono, suelo contaminado. Los principales cultivos que pueden ser afectados son los rastreos ya que se encuentran en contacto con el suelo y las hojas pueden contaminarse con bacterias patógenas que son perjudiciales para la salud humana.

Los resultados de diferentes investigaciones revelan un incremento significativo en brotes causados por agentes patógenos por el consumo de alimentos frescos (Tabla 4). Principalmente las hortalizas son portadoras de patógenos, su consumo representa un posible mecanismo de transmisión, convirtiéndose en uno de los responsable de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) (Guerrero et al., 2013; y Muñoz, 2017).

Tabla 4.

*Infecciones a nivel mundial causadas por consumir vegetales contaminados*

<b>CASOS DE MICROORGANISMOS PATOGENOS ASOCIADOS CON FRUTAS Y VEGETALES</b>				
<b>Microorganismos</b>	<b>Fecha</b>	<b>Producto</b>	<b>País</b>	<b>Observaciones</b>
<i>Escherichia coli</i>	1993	Zanahorias	U.S.A	168 casos
<i>Escherichia coli</i>	1995	Lechuga	U.S.A	Agua de riego
<i>Escherichia coli</i>	1995	Lechuga iceberg	U.S.A	Contaminación cruzada de carne.
<i>Escherichia coli</i>	1996	Lechuga	U.S.A	Por manipulación.
<i>Escherichia coli</i>	1996	Rábanos	Japón	Mayor brote del mundo 6.000 casos, 3 niños muertos.
<i>Escherichia coli</i>	1997	Zumos de manzana	U.S.A	-----
<i>Escherichia coli</i>	2006	Espinacas		199 casos reportados, 22 eran niños menores de 5, 31 desarrollaron SHU. 26 estados afectados.

<i>Escherichia coli</i>	2011	Semillas germinadas	Alemania	3.224 casos de los cuales 781 desarrollaron SHU y 22 fallecieron. 33 confirmados por ingesta de semillas.
<i>Escherichia coli</i>	2011	.....	España	17 casos reportados con SHU, 1 fallecido.
<i>Escherichia coli</i>	2011	.....	Dinamarca	26 casos, 8 reportados con SHU.
<i>Escherichia coli</i>	2011	Pepinos, Lechuga	España	Nuevo serotipo.
<i>Escherichia coli</i>	2011	Semillas Germinadas	Francia	13 casos, 9 desarrollaron SHU. 2 casos se dieron por viaje Alemania.
<i>Escherichia coli</i>	2013	Ensaladas preparadas	U.S.A	33 casos reportados 4 estados afectados
<i>Escherichia coli</i>	2014	Trébol	U.S.A	19 casos reportados 6 estados afectados.
<i>Escherichia coli</i>	2016	Alfalfa	Wisconsin	11 casos reportados 2 estados afectados
<i>Escherichia coli</i>	2018	Lechuga de hoja roja, verde, coliflor	Condado de Santa Bárbara	62 casos reportados, 25 hospitalizados y 2 presentaron SHU. 16 estados afectados.
<i>Escherichia coli</i>	2019	Ensalada César	Maryland	7 casos reportados.
<i>Escherichia coli</i>	2019	Lechuga romana	California	167 casos reportados, 85 hospitalizados y 15 desarrollaron SHU. 27 estados afectados.

Fuente:(Centro Nacional de Epidemiología, 2011; León, 2005; Prevention, 2019).

## 1.7 Vegetales de Estudio

A pesar de tratar de prevenir la contaminación microbiana en hortalizas, se ha comprobado que diversas cepas de *E. coli* han desarrollado mecanismos para infectar diferentes tipos de cultivos. Por ende, es más común la contaminación en vegetales crudos especialmente de bulbo o rastreros (lechuga, espinaca, apio, perejil), estos han ocasionado diversos brotes a nivel mundial. Estudios han demostrado que cepas de EHEC se adhieren a la planta usando sus flagelos, después infecta los tejidos internos y coloniza al vegetal (Abdul et al., 1993; Torres-Aguilar et al., 2015; y Wright et al., 2017). Los vegetales de estudio fueron:

**1.7.1 *Apium graveolens*.** Conocido comúnmente como Apio, pertenece a la familia de las Apiaceae como se observa en la Tabla 5. Es originario del Oriente Medio, es una especie de clima templado-frío, su temperatura oscila entre los 10°C a 18°C. Posee un alto contenido de vitaminas, potasio, sodio y proteínas (Pino, 2010; y Sendra et al., 2011).

**1.7.2 *Coriandrum sativum*.** Generalmente conocido como cilantro o culantro, pertenece a la familia Apiaceae. Originaria de la región mediterránea, occidental introducida y cultivada en el país. La temperatura del cultivo oscila entre los 15°C a los

21°C. Posee un alto contenido en aceites esenciales y aromáticos, una alta concentración en caroteno, calcio, vitamina B1, (Cahuasqui, 2011; y Cuenca, 2015).

**1.7.3 *Lactuca sativa*.** Conocida generalmente como lechuga, pertenece a la familia Asteraceae. Originaria de la India, es considerada uno de los grupos más importantes dentro de las hortalizas. La temperatura para su desarrollo oscila entre los 30°C y -6 °C. Aporta una gran variedad de nutrientes, vitaminas y proteínas. Se consume frecuentemente en forma de ensalada, (García, 2001; y Salinas, 2013).

**1.7.4 *Petroselinum crispum*.** Conocida comúnmente como perejil, pertenece a la familia Apiaceae. Originaria del Mediterráneo, la temperatura óptima para su crecimiento varía entre los 10°C a los 20°C. Posee un alto contenido de vitaminas A y C, generalmente se consume en forma de infusiones, en jugos y sirve de condimento, puede combatir la anemia, gastritis (Ramírez, 2011; y Sevilla, 2013).

**1.7.5 *Capsicum annum*.** Generalmente conocido como pimiento, pertenece a la familia Solanaceae. Originaria de América del Sur que crece en climas cálidos con una temperatura óptima de 18 a 21°C. Esta hortaliza es de gran consumo por su alto contenido de vitaminas A, C, calcio, fósforo y un alto nivel en fibra para una dieta regulada (Agropecuaria, 2000; y Decker, 2011).

**1.7.6 *Solanum lycopersicum*.** Conocido comúnmente como tomate riñón, pertenece a la familia Solanaceae. Originaria de la región de los Andes. Es una de las hortalizas más importantes y de mayor consumo a nivel mundial. La temperatura óptima para el desarrollo de este cultivo varía entre 21°C y 27 °C. Fuente principal de vitaminas A y C, aminoácidos y ácidos orgánicos (Ausay, 2015; y Sevilla, 2013).

Tabla 5.

*Taxonomía de los vegetales de estudio*

Clasificación taxonómica	Apio	Cilantro	Lechuga	Perejil	Pimiento	Tomate
Orden:	Asteridae	Apiales	Asterales	Apiales	Solanales	Solanales
Familia:	Apiaceae	Apiaceae	Asteraceae	Apiaceae	Solanaceae	Solanaceae
Género:	<i>Apium</i>	<i>Coriandrium</i>	<i>Lactuca</i>	<i>Petroselinum</i>	<i>Capsicum</i>	<i>Solanum</i>
Especies:	<i>Apium graveolen</i>	<i>Coriandrium sativum</i> .	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Capsicum annum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>

## **1.8. Metodología para la Identificación de microorganismos**

Existen diversas metodologías para la identificación de microorganismos. desde métodos fenotípicos hasta moleculares. Un método muy utilizado en la actualidad por su robustez y reproducibilidad es la técnica de MALDI-TOF.

### **1.8.1 MALDI-TOF (Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)**

MALDI-TOF es una técnica basada en la espectrometría de masas que permite estudiar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa, analiza biomoléculas de gran tamaño usando un láser como fuente de ionización y una matriz orgánica para facilitar el proceso; a diferencia de otro tipo de espectrómetros permite que se produzca menos fragmentos en la muestra y que la interpretación que se genere sea más sencilla (Ercibengoa y Alonso, 2018). Los espectrómetros de masas constan de 3 componentes principales que son: la fuente de ionización, el analizador y el detector. La muestra es analizada mediante MALDI (espectrometría de masas) que permite el análisis de biomoléculas, tras la ionización la muestra que pasa por un analizador tipo TOF que separa los iones en relación a masa/carga en el tiempo, los iones impactan contra el detector que obtiene la información necesaria y hace una comparación de su espectro con los perfiles proteicos (Maldonado et al., 2018; y Zboromyrska, 2014).

Este método se ha convertido en una herramienta importante para la identificación bacteriana a nivel de laboratorio; esta técnica se basa en el análisis de proteínas principalmente ribosomales (huella peptídica) a partir de colonias; el análisis que hace conlleva a la creación de un perfil proteico específico para cada especie, lo compara con perfiles almacenados en bases de datos y genera un informe de identificación (Zárate et al., 2014). La ventaja de utilizar MALDI-TOF es su alto rendimiento, aplicación en muestras sólidas, facilidad de uso y rapidez en la emisión de resultados, así como su reproducibilidad (Ercibengoa y Alonso, 2018).

## **1.9 Tipificación para y análisis de clonalidad de cepas de *Escherichia coli***

### **1.9.1 BOX-A1R**

Las técnicas de tipificación se han clasificado en fenotípicas (basadas en características bioquímicas y fisiológicas) y en genotípicas (basada en el estudio de ADN). Las técnicas

genotípicas o moleculares que analizan propiedades o polimorfismos genéticos en bacterias han ampliado notablemente el campo de la tipificación (Fernández et al., 2013).

El empleo de las técnicas de tipificación molecular es útil en la vigilancia y control de brotes epidemiológicos, ya que permite determinar la relación clonal que existe entre diferentes cepas aisladas de la misma especie, identificar los reservorios, determinar el número de clones circulantes y las vías de transmisión.

La ventaja que existe en las técnicas genotípicas es que pueden aplicarse a un número mayor de especies bacterianas y establecer una relación genética más real (Castro et al., 2009; y Fernández et al., 2013).

Los métodos de tipificación molecular pueden utilizar como diana ADN cromosómico y elementos genéticos móviles de transmisión horizontal. Se pueden clasificar en 3 tipos de técnicas que son: técnicas basadas en el estudio de perfiles de restricción del ADN, técnicas que amplifican secuencias de ADN mediante PCR y técnicas basadas en la secuenciación de genes.

La técnica de amplificación de ADN utilizan como diana genes o secuencias de ADN específicas (Fernández et al., 2013), un ejemplo de esta técnica es BOX-A1R.

## **1.10 Marco legal**

**1.10.1 Constitución del Ecuador.** Art. 13.- Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales.

Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir.

Art. 15.- El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto. La soberanía energética no se alcanzará en detrimento de la soberanía alimentaria, ni afectará el derecho al agua.

Art. 32: menciona que “La Salud es un derecho que garantiza el Estado, cuya realización se vincula al ejercicio de otros derechos, entre ellos el derecho al agua y la alimentación y otros que sustentan el buen vivir”.

Art. 361, dispone que: "El Estado ejercerá la rectoría del sistema a través de la autoridad sanitaria nacional, será responsable de formular la política nacional de salud, y normará, regulará y controlará todas las actividades relacionadas con la salud”.

**1.10.2 Ley Orgánica de Salud.** Artículo 6, Numeral 18, señala como responsabilidad del Ministerio de Salud Pública regular y realizar el control sanitario de la producción, importación, distribución, almacenamiento, transporte, comercialización, dispensación y expendio de alimentos procesados y otros productos para uso y consumo humano; así como los sistemas y procedimientos que garanticen su inocuidad, seguridad y calidad.

Art.16, dispone que: "El Estado establecerá una política intersectorial de seguridad alimentaria y nutricional, que propenda a eliminar los malos hábitos alimenticios, respete y fomente los conocimientos y prácticas alimentarias tradicionales, así como el uso y consumo de productos y alimentos propios de cada región y garantizará a las personas, el acceso permanente a alimentos sanos, variados, nutritivos, inocuos y suficientes."

Art.129, dispone que: "El cumplimiento de las normas de vigilancia y control sanitario es obligatorio para todas las instituciones, organismos y establecimientos públicos y privados que realicen actividades de producción, importación, exportación, almacenamiento, transporte, distribución, comercialización y expendio de productos de uso y consumo humano."

Art.132, establece que: "Las actividades de vigilancia y control sanitario incluyen las de control de calidad, inocuidad y seguridad de los productos procesados de uso y consumo humano, así como la verificación del cumplimiento de los requisitos técnicos y sanitarios en los establecimientos dedicados a la producción,

almacenamiento, distribución, comercialización, importación y exportación de los productos señalados"

Art.138, estipula que: "La Autoridad Sanitaria Nacional, a través de su entidad competente otorgará, suspenderá, cancelará o reinscribirá, la notificación sanitaria o el registro sanitario correspondiente, previo el cumplimiento de los trámites requisitos y plazos señalados en esta Ley y sus reglamentos."

Art.142, estipula que: "La entidad competente de la autoridad sanitaria nacional realizará periódicamente inspecciones a los establecimientos y controles pos-notificación de todos los productos sujetos a notificación o registro sanitario, a fin de verificar que se mantengan las condiciones que permitieron su otorgamiento, mediante toma de muestras para análisis de control de calidad e inocuidad, sea en los lugares de fabricación, almacenamiento, transporte, distribución o expendio."

### **1.11 Problema**

Los alimentos son la fuente principal para fomentar una buena salud; sin embargo, se encuentran expuestos a diferentes agentes patógenos, los cuales son factor principal de más de 200 enfermedades, que van desde diarrea hasta cáncer, y se estima que 420 mil personas mueren al año por esta causa (ONU, 2019). Se considera que uno de los factores principales de contaminación microbiana para los cultivos son las aguas de riego contaminadas, además, los cultivos especialmente de hortalizas que son expuestos a las heces de animales, debido a que son utilizados como fuente principal de abono (Mukherjee et al., 2004; y Muñoz, 2017).

El incremento en el consumo de vegetales ha generado una producción a mayor escala de los mismos, debido a que son productos frescos recomendados por su alto contenido alimenticio, y que se los emplea como ingredientes en una dieta saludable (Olaimat y Holley, 2012). A menudo las verduras se consumen crudas y su consumo puede resultar en la ingestión de microorganismos patógenos, el cual es un factor de riesgo potencial para la salud humana (Heaton y Jones, 2008).

### **1.12 Justificación**

*Escherichia coli* es reconocida como una de las principales enterobacterias por su alta prevalencia a nivel mundial, a pesar de que es una bacteria que habitualmente se encuentra en la microbiota humana y está presente en animales de sangre caliente, existen algunos patotipos que pueden generar graves enfermedades incluso hasta la muerte. Los patotipos más comunes y virulentos son: *E. coli* enterohemorrágico EHEC, *E. coli* enteropatógeno EPEC, *E. coli* enteroinvasivo EIEC y *E. coli* enterotoxigénico ETEC, estos patotipos son patógenos oportunistas que causan hasta el 40% de diarrea en niños menores de cinco años y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Arrobo et al., 2017; y Bhavnani et al., 2016).

Los resultados de diferentes investigaciones revelan un incremento significativo en brotes causados por agentes patógenos por el consumo de alimentos frescos y agua contaminada, según un informe de la OMS conjuntamente con la FAO más de 600 millones de personas contrajeron enfermedades transmitidas por alimentos provocando la muerte de 420.000 personas. La aparición del serotipo O157:H7 del patotipo EHEC genera gran alarma ya que es un patógeno importante en la transmisión alimentaria que

provoca graves enfermedades como el síndrome urémico hemolítico (SHU) y colitis hemorrágica (FAO/OMS, 2018).

Este trabajo se enfocó principalmente en el estudio de vegetales comercializados en Ibarra. Estos tipos de hortalizas se consumen generalmente sin un proceso de cocción, lo que permite que la carga bacteriana sea mayor, facilitando la colonización en los consumidores (Heaton y Jones, 2008). Los principales cultivos de hortalizas que pueden ser afectados son los rastrojos ya que se encuentran en contacto con el suelo y las hojas pueden contaminarse con bacterias patógenas que son perjudiciales para la salud humana. Una de las fuentes de contaminación en este tipo de hortalizas puede ser las aguas de riego y el estiércol usado como abono (Torres-Aguilar et al., 2015).

En Ecuador según el boletín N°52 emitido por el Gaceta Epidemiológica SIVE del Ministerio de Salud Pública notifica 15.387 casos de intoxicación alimentaria en el 2018, reportando en la provincia de Imbabura 13 casos en el mes de diciembre (Ministerio de Salud Pública, 2018). Es importante determinar la presencia y prevalencia de este tipo de microorganismos dentro del país, para eso es necesario recurrir a pruebas específicas usando medios de cultivo selectivos o kits rápidos que determinen la existencia de estos patotipos para así tratar de disminuir las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAS). Es primordial el control, la prevención y el manejo de las Normas HACCP (Hazard Analysis & critical Points) enfocado en el Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control para tener una buena cadena productiva evitando la contaminación (Arrobo et al., 2017).

### **1.13 Pregunta directriz de la investigación**

¿Los vegetales comercializados en la ciudad de Ibarra muestran presencia de cepas de *Escherichia coli* verotoxigénica?

### **1.14 Objetivos**

#### **1.14.1 Objetivo general.**

Caracterizar aislados de *Escherichia coli* verotoxigénica obtenidos a partir de vegetales comercializados en la ciudad de Ibarra.

#### **1.14.2 Objetivos específicos.**

Determinar la presencia de *Escherichia coli* verotoxigénica en las diferentes muestras vegetales.

Evaluar las relaciones clonales de los aislados de *Escherichia coli* verotoxigénica obtenidos en las diferentes muestras vegetales.

Generar un protocolo de vigilancia epidemiológica para la ocurrencia de *Escherichia coli* verotoxigénica en vegetales.

### **1.15 Hipótesis**

Existe la presencia de *Escherichia coli* verotoxigénica en vegetales de consumo crudo en los principales mercados de Ibarra.

## CAPITULO II

### Metodología

#### 2.1 Área de Estudio.

La presente investigación fue realizada en la ciudad de Ibarra en la provincia de Imbabura, Ecuador. La ciudad está ubicada a  $0^{\circ}21'46''\text{N}$  -  $78^{\circ}07'48''\text{O}$ , con una superficie total de  $41\text{km}^2$ , una altura de  $2\,225\text{m.s.n.m.}$ , y una población de  $131\,900$  habitantes según el censo del 2010. Las muestras vegetales fueron tomadas de tres mercados de la ciudad, denominados: Mercado 1, 2 y 3, respectivamente. (Figura 2).

El estudio también constó de una fase experimental realiza en dos laboratorios. El aislamiento, crio-preservación e identificación de genes de virulencia en los Laboratorios de Biotecnología Aplicada y Biotecnología Vegetal de la carrera de Biotecnología de la Universidad Técnica del Norte. Por otra parte, la identificación de patotipos, genes de virulencia y producción de biopelículas se realizó en el en el Laboratorio 2 del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), en Cuernavaca, Morelos – México.

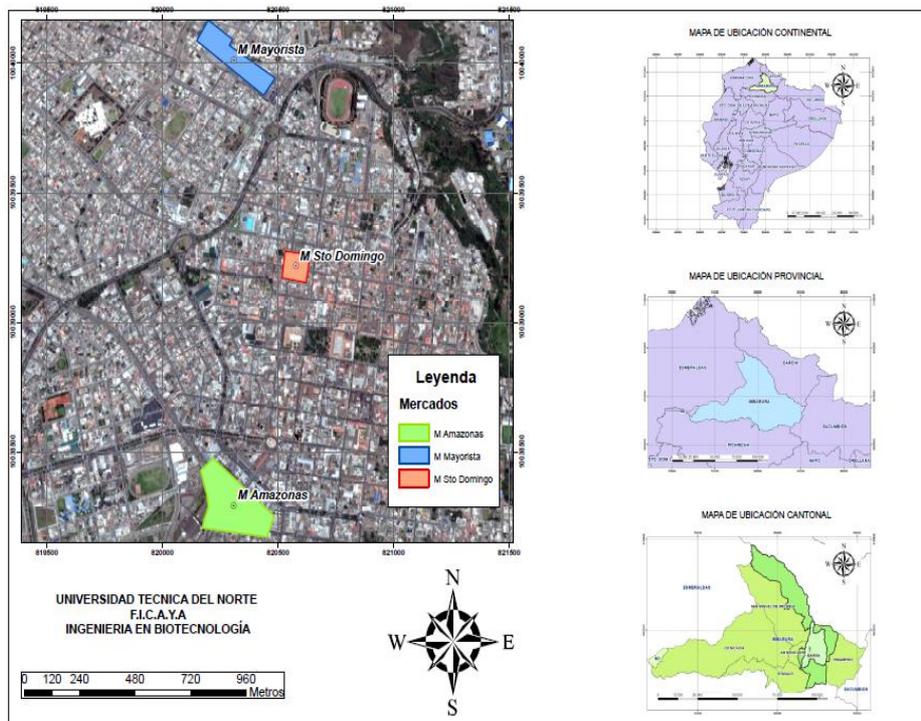


Figura 2. Mapa de la ubicación de los tres Mercados de la ciudad de Ibarra-Imbabura, incluidos en el estudio.

## **2.2 Recolección de Muestras Vegetales**

Se seleccionaron seis vegetales de estudio (apio, culantro, lechuga, perejil, pimiento y tomate) debido a su tipo de crecimiento al estar en contacto con el suelo lo que los hace susceptibles a la contaminación bacteriana (Bordenave, 2018). Las muestras vegetales fueron tomadas mediante un muestreo no probabilístico. Se tomaron tres muestras de cada vegetal en un periodo de tres semanas (tres por semana). Esto se realizó en puestos específicos que fueron seleccionados con anterioridad. Se manipuló la muestra con guantes y alcohol para evitar posible contaminación cruzada. Cada muestra fue almacenada en fundas herméticamente selladas, etiquetadas y llevadas al laboratorio para su inmediato procesamiento (Guerrero et al., 2013; y Huapaya et al., 2001).

## **2.3 Procesamiento de las muestras**

Primero, se pesaron 150 g de cada muestra vegetales escogiendo secciones de mejor calidad organoléptica (color y textura), ya que estas porciones son las que se consumirían normalmente. Posteriormente, se fraccionó cada una de las muestras. Finalmente, se colocaron en frascos de Erlenmeyer independientes con 250 ml de agua peptonada (Anexo 4) y se agitó durante 30 minutos a 180 rpm en un agitador orbital para que los microorganismos se desprendan del vegetal. (Guerrero et al., 2013 y; Muñoz, 2017).

Posteriormente, se filtró las muestras utilizando una bomba de vacío (Roker 410 ®) a través de un filtro de celulosa con poro de 0.45µm. En el vaso de la bomba, se añadió alícuotas de: 0.1, 1, y 10 ml y se aforó con 100 ml de agua destilada estéril. Para evitar contaminación entre las muestras, se realizó un proceso de limpieza del sistema de filtrado. Este consistió en colocar el vaso de filtración sumergida en hipoclorito de sodio al 70% durante cinco minutos. Posteriormente, se sumergió el vaso en alcohol étílico durante cinco minutos. Finalmente, se lavó con agua destilada. (Ortega et al., 2018)

El filtro fue colocado en cajas de Petri con medio de cultivo MacConkey correctamente etiquetadas (Anexo 5 y 6). Después se procedió a incubar las cajas a 37°C durante 24 horas, Al siguiente día se observó el crecimiento y se realizó un conteo de colonias especificando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante el uso del estereoscopio.

## 2.4 Aislamiento de cepas de *Escherichia coli*

Para el aislamiento de cepas se tomó en cuenta la morfología característica de colonias de *Escherichia coli* en el medio de cultivo MacConkey (color rosado intenso no mucoide). Se tomaron de 1 a 2 colonias de cada caja de Petri dependiendo del crecimiento que haya existido en cada filtro, y se transfirieron mediante la técnica de agotamiento a nuevas cajas de Petri con medio MacConkey, se incubaron a 37°C durante 24 horas, el procedimiento se lo repitió hasta obtener una cepa pura (Gutiérrez Romero et al., 2017; y Ortega et al., 2018).

## 2.5 Identificación de especie mediante MALDI-TOF

Las cepas aisladas se enviaron vía terrestre a un laboratorio especializado en la ciudad de Guayaquil para la identificación de especie mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF.

## 2.6 Crío-preservación de los aislados

En un tubo Eppendorf de 2 ml se colocó 700 µl de caldo TSB y 300 µl de glicerol estéril. Después, se inocularon de 4 a 5 colonias en los tubos, se homogenizaron las muestras y se etiquetaron. Finalmente, se colocaron en congelación a -20°C (Gutiérrez Romero et al., 2017; y Ortega et al., 2018). Este procedimiento se realizó para la conservación/preservación de las bacterias aisladas.

## 2.7 Extracción de ADN

Primero, se tomó 2 a 3 colonias y se colocó en un tubo eppendorf con 1 ml de agua destilada autoclavada. Se homogenizó la muestra mediante vórtex (Labnet ®) y se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 rpm. Después se desechó el sobrenadante y se repitió una vez más el mismo procedimiento. Posteriormente, se colocó 500 µl de agua destilada autoclavada, se homogenizó y se colocó en un termobloque (Labnet ®) a 96° C durante 10 minutos. Finalmente se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm y se recuperó el sobrenadante que contiene el ADN en un nuevo eppendorf estéril, el procedimiento se describe en la figura 3 (Rodrigues et al., 2016).

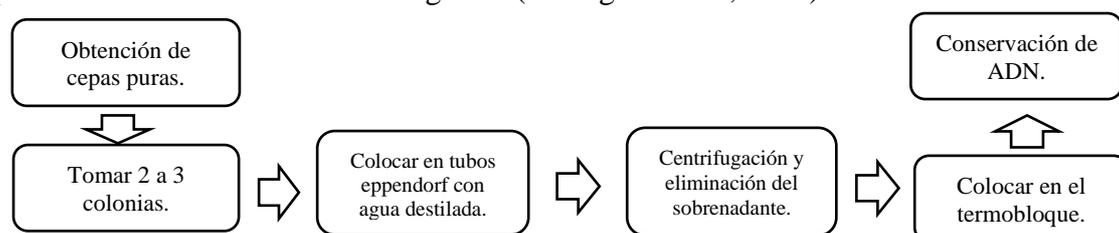


Figura 3. Diagrama de proceso de extracción de ADN de *Escherichia coli*.

## 2.8 Identificación molecular de *Escherichia coli* verotoxigénica y otros patotipos

La identificación se realizó mediante PCR utilizando iniciadores específicos para los genes de virulencia de *Escherichia coli*, detallados en la Tabla 6. La presencia de estos genes permitirá identificar si los aislados pertenecen a algún patotipo (Müller et al., 2007).

Tabla 6.

*Genes de virulencia para la identificación de los patotipos de Escherichia coli*

<i>Gen</i>	<i>Patotipo</i>	<i>Tamaño (pb)</i>	<i>Secuencia 5' a 3'</i>	<i>Temperatura Annealing</i>
<i>eae</i>	EPEC, EHEC	579	<b>F</b> AGGCTTCGTCACTGTG <b>R</b> CCATCGTCACCAGAGGA	58
<i>exha</i>	EHEC	670	<b>F</b> CCGTATCTTATAATAAGACGG <b>R</b> CCTCCTTCATCTGCAATTG	58
<i>Stx1</i>	EHEC	244	<b>F</b> CACATATAAATTATTTCCTC <b>R</b> TCAACGAAAATAAECTCGCTGAATCCC	58
<i>Stx2</i>	EHEC	124	<b>F</b> CAGTTAATGTGGTTGCGAAGGAATTTACC <b>R</b> ATGAAGTGATATTATTTAAATGGGTACTGTG	58
<i>fliC</i>	EHEC	645	<b>F</b> AGCTGCAACGGTAAGTGATTT <b>R</b> GGCAGCAAGCGGGTTGCTC	60
<i>rfbE</i>	EHEC	310	<b>F</b> CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGGTC <b>R</b> TTAGAATGAGACCATCCAATAAG	59
<i>bfpB</i>	EPEC	910	<b>F</b> GACACCTCATTGCTGAAGTCG <b>R</b> CCAGAACACCTCCGTTATGC	58
<i>invE</i>	EIEC	766	<b>F</b> CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG <b>R</b> CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC	58
<i>aggR</i>	EAEC	400	<b>F</b> ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG <b>R</b> AATACAGAATCGTCAGCATCAGC	58
<i>estIa</i>	ETEC	157	<b>F</b> CCTCTTTTAGYCAGACARCTGAATCASTTG <b>R</b> CAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG	58
<i>estIB</i>	ETEC	171	<b>F</b> TGTCTTTTTCACCTTTTCGCTC <b>R</b> CGGTACAAGCAGGATTACAACAC	58
<i>astA</i>	EAEC	102	<b>F</b> TGCCATCAACACAGTATATCCG <b>R</b> ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT	58

*Fuente: (Lorenz et al., 2013; Müller et al., 2007; Prakasan et al., 2018).*

## 2.8.1 Reacción en cadena polimerasa

Para la PCR se utilizó la polimerasa comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega). La reacción PCR tuvo un volumen de 25 µl, contenía: 12.5 µl de Master Mix GoTaq® Green Master Mix, 0.5 µl de primer forward, 0.5 µl de primer reverse (eurofins®), 1.5µl de cloruro de magnesio MgCl<sub>2</sub> (Promega®), 3 µl de ADN bacteriano y 8.5 µl de agua destilada estéril. Se utilizó agua estéril como control negativo (Müller et al., 2007).. Los tubos fueron colocados en el termociclador (SimpliAmp®). El programa de amplificación se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7.

Programación de PCR para los genes de estudio

<i>Gen fliC_F</i>		
<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<i>Desnaturación inicial</i>	94° C	5 minutos
<i>Desnaturación cíclica</i>	94° C	1 minutos
<i>Anillamiento</i>	57° C	30 segundos
<i>Extensión cíclica</i>	72° C	1 minuto
<i>Extensión final</i>	72° C	7 minutos
<i>N° de repetición de ciclos: 30</i>		
<i>Conservación</i>	4° C	tiempo indefinido
<i>Genes: eae, exhA, Stx1, Stx2, bfpB, invE, aggR, estIa, estIb, astA</i>		
<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<i>Desnaturación inicial</i>	94° C	5 minutos
<i>Desnaturación cíclica</i>	94° C	1 minutos
<i>Anillamiento</i>	58° C	30 segundos
<i>Extensión cíclica</i>	72° C	1 minuto
<i>Extensión final</i>	72° C	7 minutos
<i>N° de repetición de ciclos: 30</i>		
<i>Conservación</i>	4° C	tiempo indefinido
<i>Gen rbf_E</i>		
<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<i>Desnaturación inicial</i>	94° C	5 minutos
<i>Desnaturación cíclica</i>	94° C	1 minutos
<i>Anillamiento</i>	59° C	30 segundos
<i>Extensión cíclica</i>	72° C	1 minuto
<i>Extensión final</i>	72° C	7 minutos
<i>N° de repetición de ciclos: 30</i>		
<i>Conservación</i>	4° C	tiempo indefinido

### 2.8.2 Electroforesis de la amplificación de los genes de virulencia.

Se preparó 80 ml de gel de agarosa al 1% (Invitrogen®) en tampón TBE (1x) y se colocó 3µl de SYBR Safe, (Invitrogen®), homogenizando la mezcla.

Se vertió la preparación en un molde de electroforesis (Labnet®) permitiendo su polimerización en oscuridad durante 15 minutos. Posteriormente, el molde con el gel de agarosa fue colocado dentro de la cámara de electroforesis que contenía solución tampón TBE (1x). Se colocó en los pocillos 25 µl de cada producto de PCR. Se usó 3 µl del marcador de peso molecular ADN de 1 Kb (abm®, Invitrogen ®), se cargó las muestras en el siguiente orden: Primero se colocó el marcador de peso molecular ADN de 1 Kb (abm®, Invitrogen ®), segundo se colocó el control negativo, tercero se colocó el control positivo y cuarto se colocaron las demás muestras. El gel fue sometido a 5.0 V/cm durante 45 minutos.

Los productos de electroforesis fueron visualizados en un transiluminador (Cleaver®) para luego ser fotodocumentados.

### 2.9 Biopelículas

La habilidad de formar biopelículas es considerada un factor de virulencia. Para el estudio de la producción de biopelículas en *Escherichia coli*, se preparó cultivos de las cepas en tubos de ensayo con 5 ml de caldo LB. Después, se transfirió 50 µl del cultivo bacteriano a nuevos tubos con medio LB al 50%, posteriormente se tomó 200 µl de esta nueva dilución y se colocó en placas de poliestireno de fondo redondo de 96 pocillos para cultivo celular como se detalla en la Figura 4. Las placas se incubaron a temperaturas de 30°C y 37°C durante 3 días por duplicado.

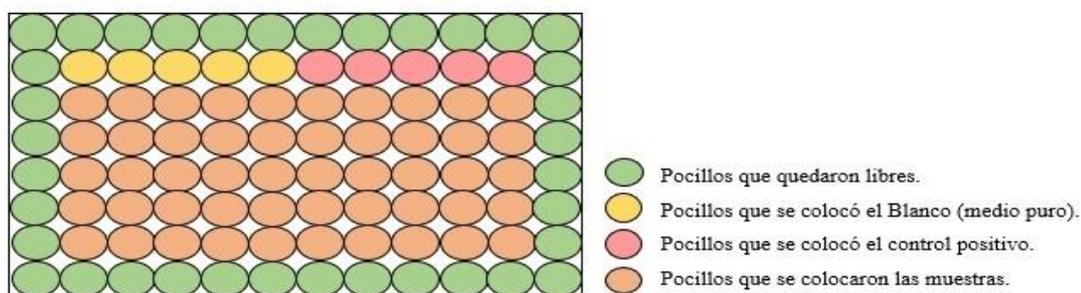


Figura 4. Descripción de la placa de lisa. (96 pocillos). Los pocillos de color verde se dejaron libres, en los pocillos de color amarillo se colocó el blanco, y en los pocillos de color rosado se colocó el control positivo (rosado) que consistió de una cepa caracterizada del patotipo EPEC y en los pocillos de color naranja se colocaron los cultivos bacterianos, una cepa en cada 5 pocillos.

Al tercer día se realizó la primera lectura mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 620nm de una de las repeticiones, tanto con incubación a 30°C como a 37°C.

Posteriormente, esta repetición fue lavada con 200 µl de PBS (buffer salino de fosfato) desechando rápidamente el buffer; se repitió el procedimiento 3 veces. Después, se colocó 200 µl de metanol dejando reposar durante 15 minutos con la tapa para evitar la evaporación, se desechó el metanol y se permitió su completa evaporación. Después, se colocó 200 µl de cristal violeta durante 10 minutos, se enjuagó con agua destilada 3 veces y se permitió su completa evaporación. Finalmente, se agregó 200 µl de ácido acético al 33%, se colocó en agitación durante 5 minutos y se procedió a leer en el lector de microplacas a una longitud de onda de 560 nm. Al cuarto día de incubación, se repitió todo el procedimiento con la otra repetición, tanto con incubación a 30° C como a 37° C. Se analizó la relación 560/620 nm comparando con el control EPEC para evaluar la producción de biopelículas(Castillo et al., 2018)

## 2.10 Tipificación para análisis de clonalidad de cepas de *Escherichia coli*

**2.10.1 PCR palindrómica extragénica repetitiva basada en BOX-A1R.** Se uso BOX-PCR para identificar la relación clonal de los aislados de *E. coli* presentes en los vegetales de estudio. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25µL que incluyó: 12.5µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 4µl de ADN, 2 µl del iniciador universal BOX-A1R, 0.5 µl de MgCl<sub>2</sub> y aforando con agua destilada estéril. Se usó agua estéril como control negativo (Osek, 2002). En la Tabla 8 se observa el programa de amplificación.

Tabla 8.

*Programación de PCR para el análisis de clonalidad mediante BOX-A1R*

<b>BOX-A1R</b>		
<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<i>Desnaturación inicial</i>	94° C	5 minutos
<i>Desnaturación cíclica</i>	94° C	1 minuto
<i>Anillamiento</i>	40° C	2 minutos
<i>Extensión cíclica</i>	72° C	2 minutos
<i>Extensión final</i>	72° C	10 minutos
<i>N° de repetición de ciclos: 35</i>		
<i>Conservación</i>	4° C	tiempo indefinido

### **2.10.2 Electroforesis del producto de BOX-PCR.**

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2.0%, siguiendo las especificaciones del apartado 2.2.9.1, cargando directamente 15 µl de la muestra en cada pocillo y sometiendo al gel a 5.0 V/cm durante 70 minutos. Se visualizó en un transiluminador y se fotodocumentó.

### **2.10.3. Análisis del producto de BOX-PCR**

El patrón de bandas, resultado de la BOX-PCR se analizó usando el módulo Fingerprint Data del programa bioinformático bioNumerics v.7. Se construyó un dendrograma UPGMA utilizando el índice de DICE.

## **2.11 Elaboración del Protocolo de Vigilancia Epidemiológica cepa O157:H7**

Para el diseño del Protocolo se tomó recomendaciones de normas establecidas en otros países enfocándose tales como: reservorios, vías de transmisión, cuadro clínico, confirmación de especie, medidas de prevención y control, y las características primordiales que presenta la cepa O157:H7 dentro de las hortalizas que hemos estudiado. Sin embargo, no existen protocolos para el área ambiental ya que hay más prioridad para la parte clínica; no obstante, se ha elaborado un protocolo basado en el área ambiental y el lugar donde expenden los vegetales.

Se estableció medidas para la identificación microbiológica de la cepa como: pruebas químicas y moleculares. En las pruebas químicas se han mencionado diferentes medios tanto sólidos como líquidos que ayudan a aislar e identificar la presencia de la bacteria; se ha basado en los medios usados durante el trabajo experimental y en otros estudios realizados en la misma cepa. Adicionalmente, después de aislar la cepa se deben usar pruebas moleculares que confirmen la existencia del microorganismo, se han nombrado primers específicos para la verificación del antígeno somático O157 y flagelar H7.

Por otro lado, se propuso medidas ante un posible brote producido por la cepa O157:H7 y se realizó recomendaciones para evitar un contagio.

## 2.12 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del estudio, los datos obtenidos fueron ingresados en el programa estadístico SPSS v.12. Se realizó prueba de contingencia de chi-cuadrado entre tipo de vegetal y tipo de bacteria, de la misma forma se evaluó la contingencia entre mercado y tipo de bacteria. Se realizó una prueba de análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si el número de microorganismos es dependiente de los factores mercado y tipo de vegetal. Los datos fueron evaluados para constatar si cumplían los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad mediante pruebas de Leven y Shapiro Wilks respectivamente. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados como significativos.

Por otro lado, para el análisis clonal se evaluó, mediante el cálculo del índice de diversidad de Simpson, que se basa en la comparación de diferentes poblaciones muestreadas, la fórmula empleada fue:  $D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{nj=1}^S nj(nj - 1)$ . Donde N es el número total de cepas en la muestra poblacional, S es el número total de patrones de bandas descritos y nj es el número de cepas que pertenecen al mismo patrón de bandas estudiado. Mediante la esta ecuación se calcula la probabilidad de que una cepa muestreada pertenezca al mismo grupo poblacional (Hunter y Gaston, 1988).

## CAPÍTULO III

### Resultados

#### 3.1 Número de Unidades Formadoras de Colonias

Se obtuvo un total de 64 muestras vegetales, las cuales fueron analizadas y sembradas en diferentes diluciones, arrojando como resultado final 180 cultivos microbianos. El ANOVA para el número de unidades formadoras de colonias identificado en cada tipo de vegetal mostró diferencias significativas ( $F:2.428$ ;  $gl: 5$ ;  $p<0.001$ ), de igual forma para cada mercado ( $F:1.195$ ;  $gl:2$ ;  $p<0.000$ ). Por otra parte, la interacción entre vegetal y mercado no presentó diferencias significativas ( $F:1.021$ ;  $gl:10$ ;  $p= 0.229$ ).

Se evidenció que los vegetales de estudio del Mercado 1 presentaron mayor número de unidades formadoras de colonias (figura 5).

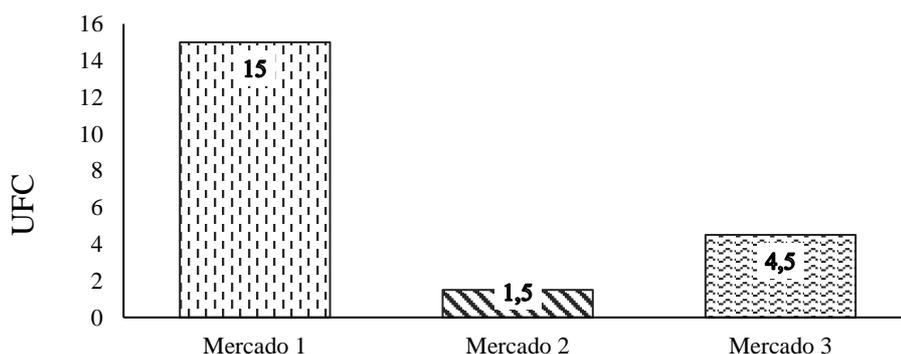


Figura 5. Mediana de las unidades formadoras de colonia presentes en las muestras de los mercados en estudio.

Se demostró que el apio y perejil son los vegetales que mayor unidades formadoras de colonias presentaron (figura 6).

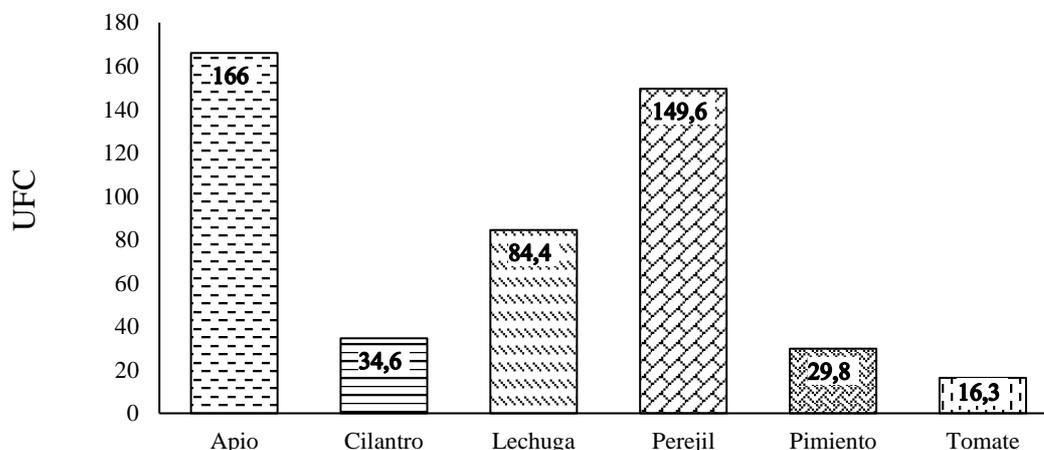


Figura 6. Mediana de las unidades formadoras de colonias presentes en los vegetales de estudio.

### 3.2 Aislamiento e Identificación de Aislados

La prueba de Chi-cuadrado resultó en contingencia entre los aislados obtenidos y el mercado en el cual fue tomada la muestra ( $\chi^2=57.35$ ;  $gl= 26$ ;  $p<0.00$ ). Se puede observar que el Mercado 1 y 2 presentan mayor presencia de *Escherichia coli* con un total de 12 y 11 cepas respectivamente. En total se pudieron identificar 29 cepas de *E. coli*. (figura 7).

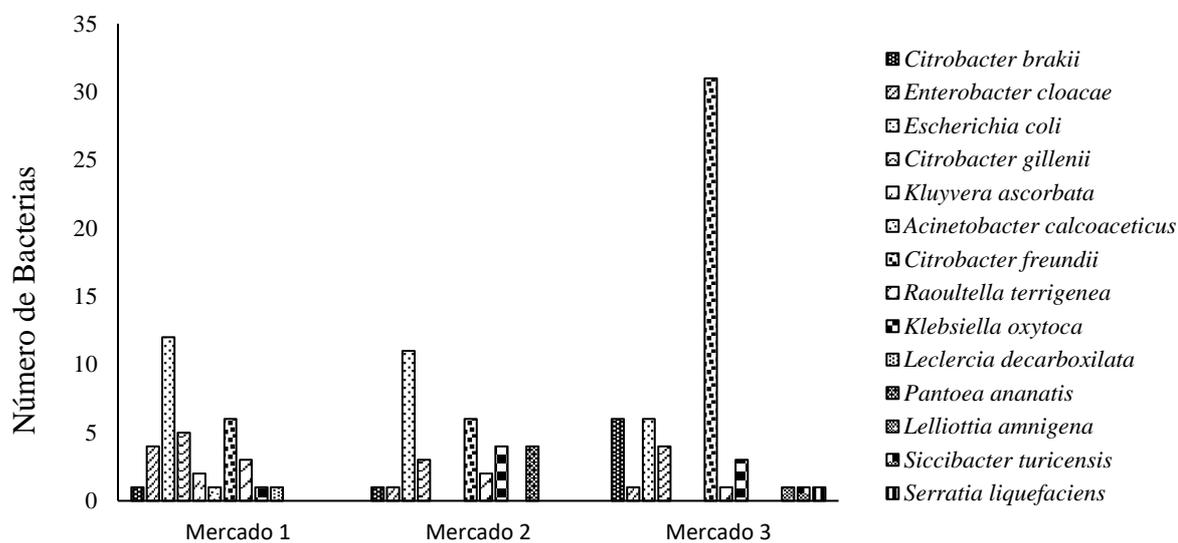


Figura 7. Identificación de bacteriana presentes en los mercados mediante Maldi-Tof.

De igual forma, con la prueba Chi-cuadrado se demostró que no existe contingencia entre el número de aislados obtenidos de cada especie y el tipo de vegetal ( $\chi^2=75.04$ ;  $gl= 65$ ;  $p=0.185$ ). Los vegetales que presentaron mayor cantidad de *Escherichia coli* son el apio y el perejil con 6 muestras cada uno, el tomate presentó aislados de *E. coli* en menor cantidad, pero presento mayor cantidad de *Citrobacter freundii*, en un total de 15 muestras (figura 8). Anexo Tabla con Datos crudos.

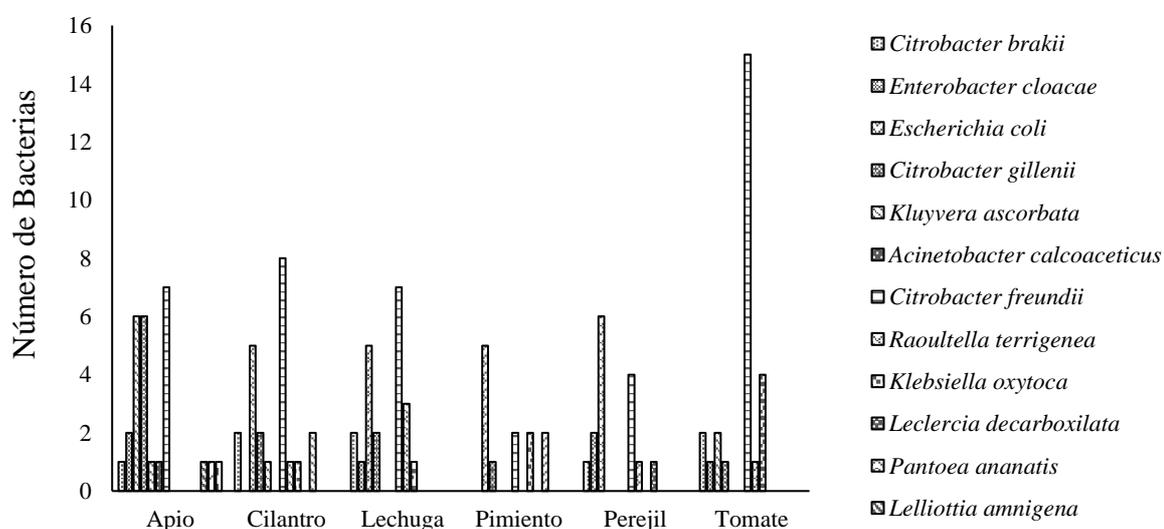


Figura 8. Identificación de microorganismos en vegetales mediante Maldi-Tof

### 3.3 Identificación de Genes de Virulencia de *Escherichia coli*.

De los 29 aislados de *Escherichia coli* se identificó un total de 19 cepas que presentaron diferentes genes de virulencia (Figura 9), de los cuales 8 pertenecen al gen *fliC* característico del patotipo EHEC, y 18 pertenecen al gen *astA* característico del patotipo EAEC. Se puede evidenciar que el Mercado 2 posee mayor cantidad de cepas con genes con un total de 4 genes *fliC* y 9 genes *astA*.

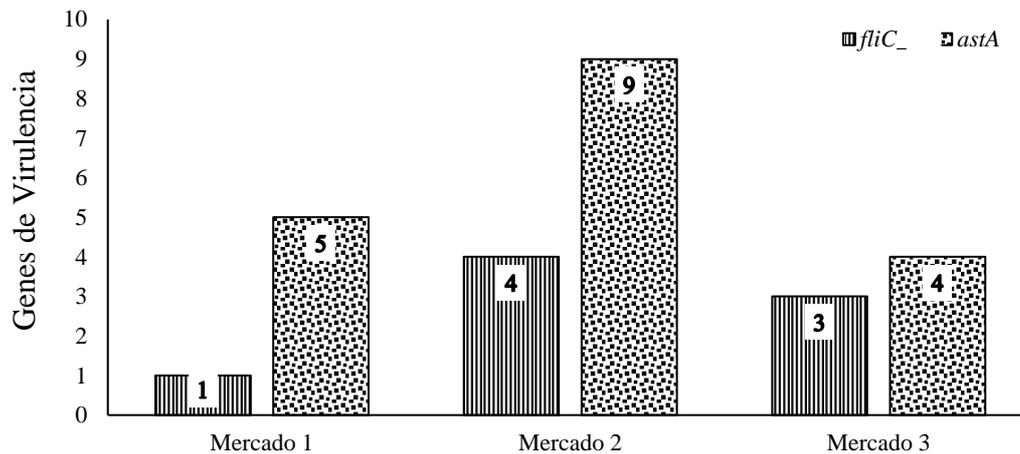


Figura 9. Presencia de genes de virulencia en los mercados de estudio.

En cuanto a la presencia de los genes de virulencia en los diferentes vegetales (Figura 10), el perejil mostró mayor presencia de genes de virulencia: 4 cepas con el gen *astA* y 3 con el gen *fliC*.

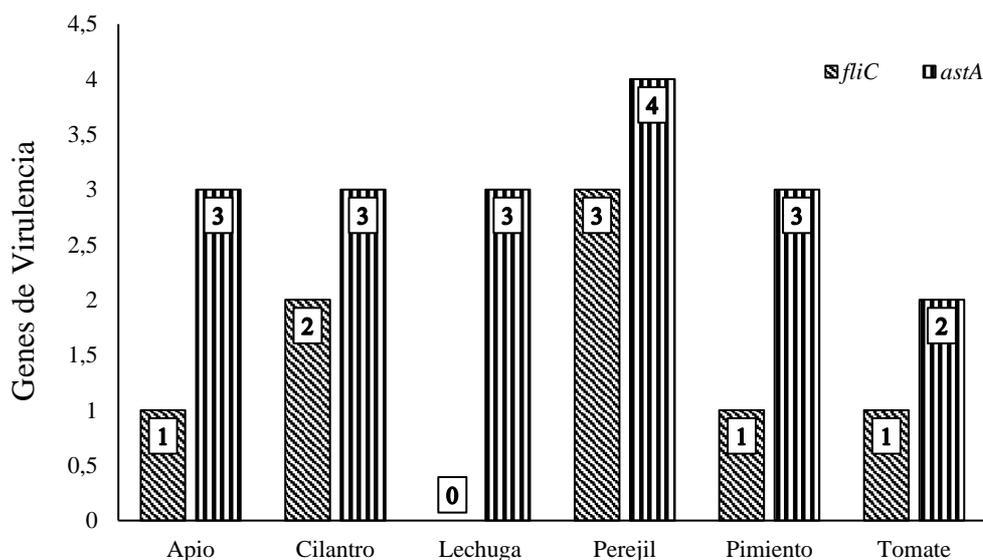


Figura 10. Vegetales de estudio que tienen presencia de los genes de virulencia.



### 3.5 Amplificación del gen *fliC*

De igual manera, mediante electroforesis, se comprobó la presencia del gen *fliC* (645pb). Ocho muestras de diferentes vegetales amplificaron producto para este gen de virulencia (figura13).

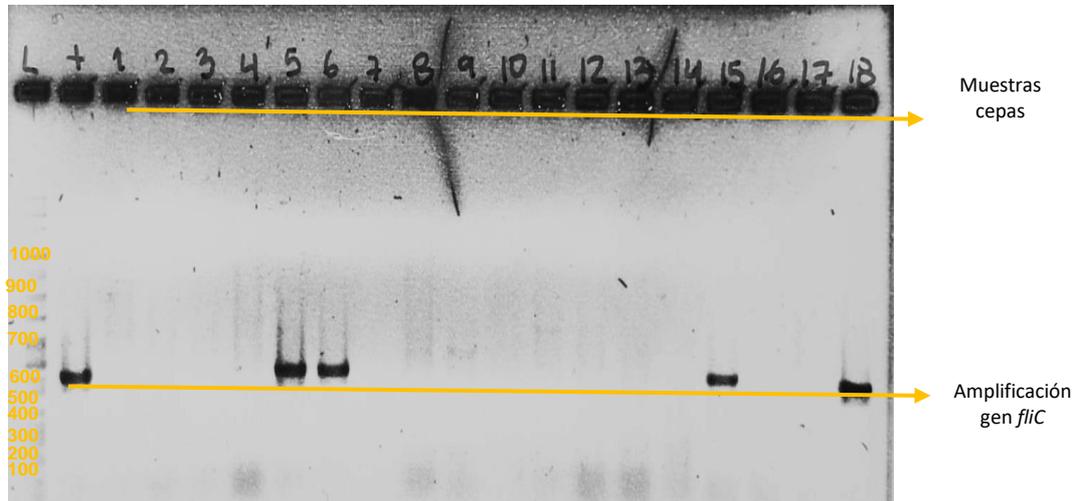


Figura 13. Amplificación del gen *fliC* en gel de agarosa al 1%. L) Marcador Molecular de 1kb, +) Control positivo, 1 - 18) Muestras.

### 3.6 Formación de Biopelículas

El análisis de la producción de biopelículas en los aislados de *E. coli* estudiados evidenció 19 de las cepas con desarrollo de biopelículas, a una temperatura de 30°C y en comparación con la cepa control EPEC. El rango de 1.5 en adelante evidencia el crecimiento y producción de biofilm. Por otro lado, se comprobó que a 37°C las cepas no generan biopelículas (figura 14).

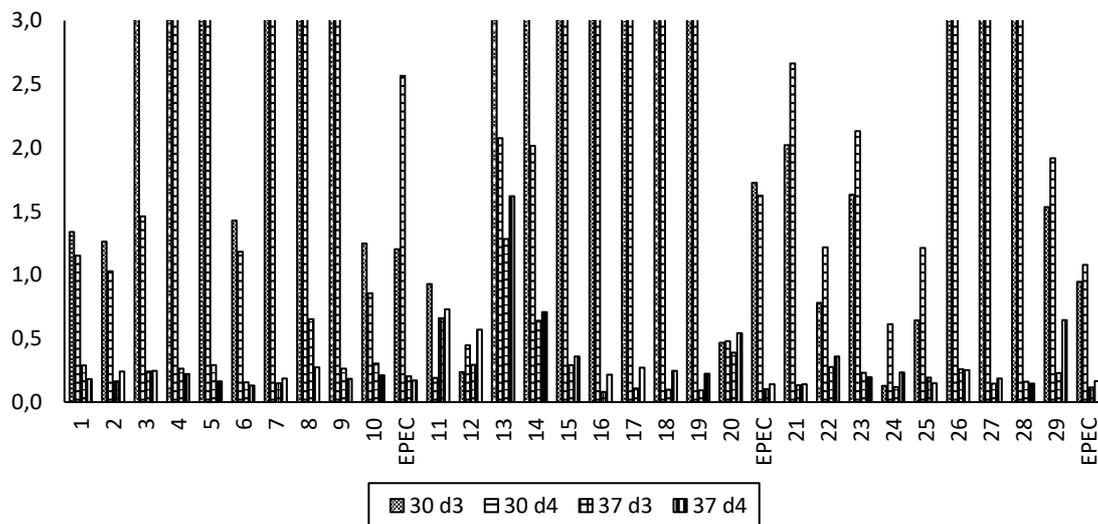


Figura 14. Producción de biopelículas de cepas de *Escherichia coli*, el rango de 1.5 en adelante muestra la formación de biopelículas, se usó una cepa del patotipo EPEC como control positivo.

### 3.7 Técnica de Tipificación para analizar la clonalidad de cepas de *Escherichia coli*

**3.7.1 BOX – PCR de cepas de *Escherichia coli*.** Se analizaron un total de 29 cepas de diferentes vegetales, las cuales produjeron 29 diferentes patrones de bandas distintivos.

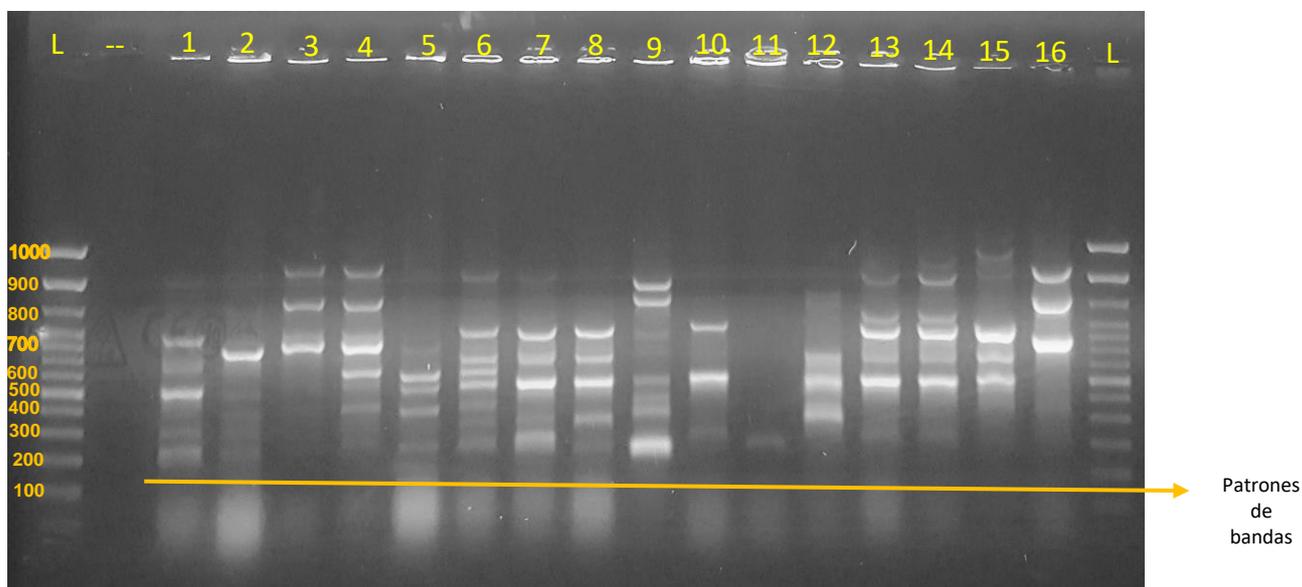


Figura 15.- Electroforesis del producto de BOX-PCR de los aislados de *Escherichia coli* en gel de agarosa al 2%. L) Marcador Molecular de 1000pb (pares de bases), --) Control negativo, 1 - 16) Muestras.

**3.7.2 Construcción del Dendrograma UPGMA y análisis de clonalidad.** Los patrones de bandas obtenidos del BOX-PCR, fueron analizadas mediante el programa BioNumerics v.7, como se detalla en la metodología. Se construyó un dendrograma UPGMA (figura 15) el cual mostró que existen 29 perfiles diferentes de *Escherichia coli*; no se observó patrones idénticos. El cálculo del índice de la diversidad, mediante la fórmula de Simpson, fue de 0.66, esto indica que existe diversidad en las cepas de *Escherichia coli* obtenidas.

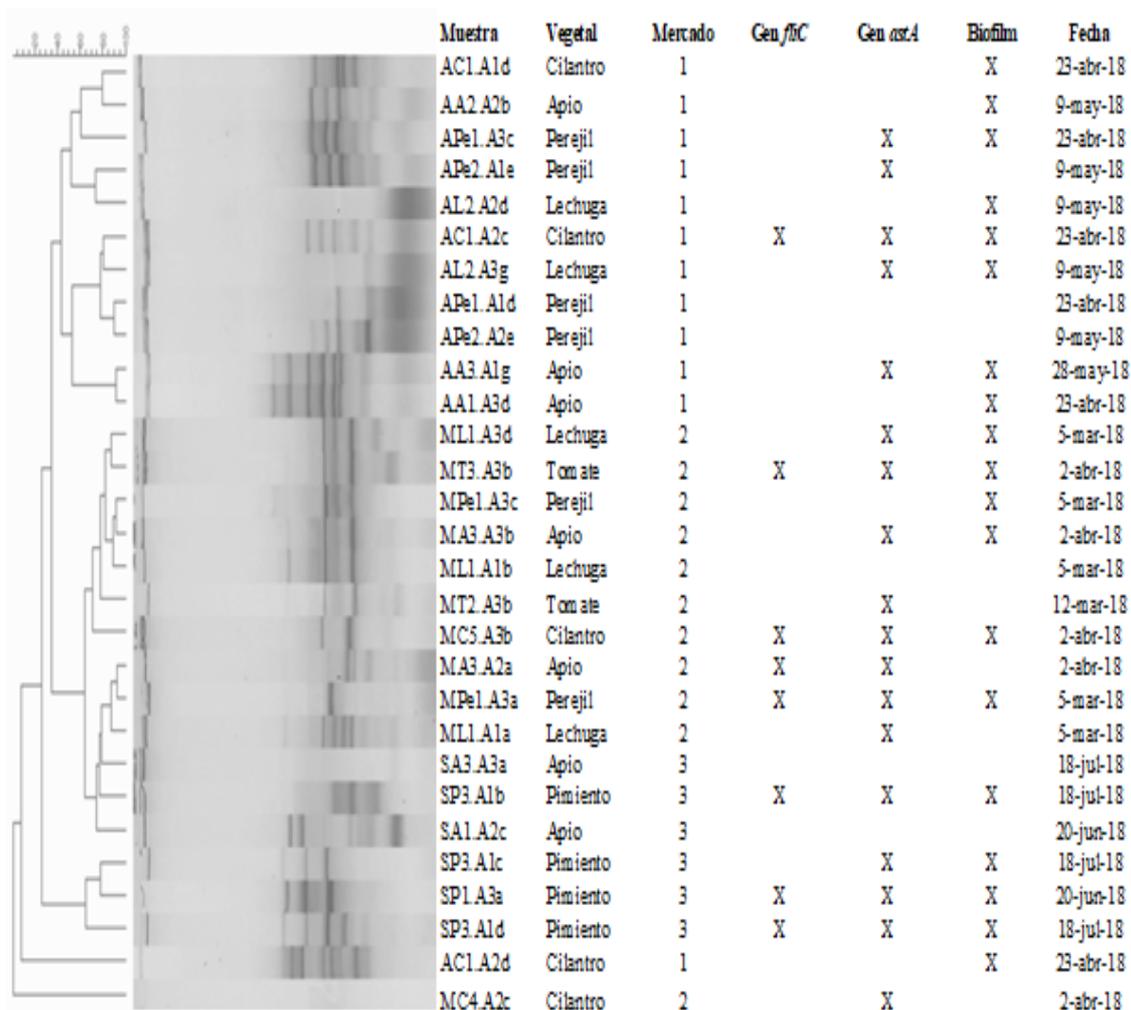


Figura 16.- Análisis de conglomerados de patrones de bandas de *Escherichia coli* obtenidas por BOX-PCR. El dendrograma fue generado en BioNumerics v.7 y muestra la relación clonal en las diferentes cepas. Se presenta el tipo de vegetal, mercado, presencia/ausencia de los genes de virulencia identificados y la fecha de colección de la muestra, de cada aislado de *E. coli*.

### 3.8 Elaboración del Protocolo de Vigilancia Epidemiológica

El protocolo elaborado es aplicable y tiene como finalidad poner en conocimiento las medidas que se deben llevar para monitorear la presencia de la de *E. coli* O157:H7 en los productos vegetales comercializados en mercados de la ciudad de Ibarra. El protocolo en detalle se puede observar en el Anexo 7.

## CAPITULO IV

### Discusión

#### Aislamiento de Bacterias

Se estudió un total de 64 vegetales que fueron muestreados en la ciudad de Ibarra. Esta investigación abarco tres mercados, en los cuales se identificó la presencia de diferentes organismos tales como: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia*, sin embargo, cabe recalcar que el Mercado 1 presentó mayor cantidad de microorganismos. Esto demuestra que las hortalizas expandidas en estos establecimientos presentan microorganismos con potencial patógeno para el ser humano. Los resultados obtenidos concuerdan con otras investigaciones hechas en vegetales, ya que demuestran que el consumo de productos frescos puede resultar en brotes epidemiológicos causando enfermedades infecciosas. Las bacterias más frecuentemente encontradas son: *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., entre otras, y algunas de ellas presentan resistencia antimicrobiana y genes de virulencia (Adegun et al., 2019; Alemu et al., 2018; Denis et al., 2016; Heaton y Jones, 2008; Paramithiotis et al., 2017; Van Ha et al., 2008; Vojkovská et al., 2017; y Yousuf et al., 2018).

Es probable que uno de los posibles orígenes para la contaminación con *Escherichia coli* en los vegetales estudiados sea el agua de riego, ya que las hortalizas son más propensas a ser invadidas por diferentes microorganismos. Estudios afirman que el agua de riego puede ser una fuente de contaminación que almacena diferentes microorganismos, causando que las plantas rastreras presenten mayor carga bacteria, por el hecho de estar en contacto con el suelo (Díaz et al., 2014; y Solomon et al., 2002). Adicionalmente, diversas investigaciones realizadas en hortalizas han demostrado que la aplicación de estiércol de animales genera mayor contaminación bacteriana, y por lo tanto es un riesgo para la salud humana (Machado et al., 2006; Mukherjee et al., 2004 y Rivera et al., 2009).

## Identificación de Aislados

La identificación de aislados mediante Maldi-Tof, identificó la presencia de 29 aislados de *Escherichia coli*. Esto, posiblemente se deba al uso de abono no tratado o agua de riego contaminado. Los productos que presentaron mayor frecuencia de *E. coli* fueron: apio, lechuga y perejil, lo que concuerda con el estudio realizado por Ortega et al., (2018) en un mercado de Quito-Ecuador, en donde demostró que de un total de 90 vegetales estudiados la mayor carga bacteriana se presentó en muestras de perejil, cilantro, lechuga y alfalfa. Por otro lado en Perú, un estudio realizado por Rivera et al., (2009) señaló la presencia de *E. coli* en vegetales; en esa investigación se recolectó 85 muestras de vegetales tipo hoja y bulbo, como perejil, cebolla, rábano, culantro y lechuga, las cuales revelaron que más del 24% del total de las muestras presentó *E. coli*, especialmente en perejil, lechuga y rábano. Por el contrario, Alemu et al., (2018) basó su estudio en repollo, lechuga, zanahoria, tomate y pimiento en el cual recolectó 347 muestras y comprobó que el repollo es el que mayor presencia de *Escherichia coli* presentó, afirmando que los vegetales tipo hoja presenta más carga microbiana, por lo que están en contacto con el suelo y son más propensos a la contaminación .

Los resultados reafirman los hallazgos de otras investigaciones en los cuales los vegetales tipo hoja tales como: apio, lechuga y perejil evidencian la presencia de *Escherichia coli* en mayor cantidad. Brandl, (2008) y NandaKafle et al., (2018) afirman que *E. coli* actúa directamente con la planta, mediante los flagelos se adhiere y penetra la pared celular y después coloniza los tejidos y estomas de las hojas, lo que le permite multiplicarse dentro de la planta durante el crecimiento. Se podría indicar que esta es la razón por la cual, en vegetales tipo hoja la eliminación de las bacterias es difícil y se encuentre en mayor número.

Por otro lado, se logró aislar *Escherichia coli* en 2 muestras de tomate. Un estudio realizado en México por Ocaña de Jesús et al., (2018) y Gómez et al., (2012), y otro en Japón por Watanabe et al., (1999) demostraron que existen cepas de *E. coli* que no solo se encuentra en vegetales tipo hoja, sino también en vegetales de tipo fruto como son: el tomate y el rábano. Estos investigadores afirman que las cepas colonizan este tipo de vegetales en menor cantidad, por esto no es muy común encontrar su presencia.

Las cepas de *Escherichia coli* encontradas en los diferentes vegetales son un claro ejemplo de contaminación microbiana. *E. coli* es el principal responsable de infecciones

intra-intestinales. Según estudios realizados en el Ecuador las enfermedades causadas por diferentes patotipos de *Escherichia coli* son la segunda causa de morbilidad y mortalidad (Chango y LLano, 2017; y Rojas Silva, 2008).

En la presente investigación se identificó la presencia de *Citrobacter freundii*. Esta bacteria a menudo produce infecciones en el tracto gastrointestinal y comúnmente se encuentra en la tierra y en el agua. Según estudios realizados por Ben Said et al., (2015), Splittstoesser et al., (1980), y Van Hoek et al., (2015), en vegetales tipo hoja (lechuga, espinaca, cilantro) y fruto (pepino, pimiento, tomate, zanahoria), han detectado la presencia de *Citrobacter freundii*, además han identificado que posee resistencia a ciertos antibióticos como las cefalosporinas de 3 generación al ser productoras de betalactamasas de espectro extendido BLEE, confirmando que el consumo de vegetales crudos pueden ser una amenaza para la salud humana: esto a su vez depende de la carga de células bacterianas ingeridas. Los datos de la investigación concuerdan con este estudio, ya que se identificó aislados de *Citrobacter freundii* en muestras de tomate, cilantro y lechuga; es posible que la contaminación se pueda generar antes de que los alimentos sean expendidos.

Por otro lado, Al-Jaboobi et al., (2013) confirma la presencia de *Citrobacter freundii* en aguas no tratadas que se utilizan para el riego de cultivos, de lo cual se puede asumir que las hortalizas están contaminadas antes de ser expendidas. Sin embargo, Francisco (2009); González Ardón et al. (1982); y Rev et al. (2017) muestran casos aislados en ambientes hospitalarios, que comúnmente se han aislado de urocultivos de pacientes neonatos y adultos mayores, lo que denota su importancia en la salud y la relevancia de haber identificado esta especie en los vegetales analizados.

### **Identificación de genes de virulencia y Patotipos de *Escherichia coli***

En el presente estudio se logró identificar el gen *fliC* propio del serotipo H7 y que pertenece al patotipo enterohemorrágico, y el gen *astA* del patotipo agregativo, sin embargo, no se pudo evidenciar la presencia de los genes *Stx1* ni *Stx2* del patotipo verotoxigénico o STEC, ni tampoco el gen *rfbE* propio del serotipo O157 y del patotipo enterohemorrágico, además no se encontró ningún otro gen que pertenezca a otro patotipo. Diferentes estudios realizados en Ecuador por: Arrobo y Zurita (2017); Bastidas (2018); Chango y LLano (2017) y Rojas Silva (2008) demuestran la presencia de diversos patotipos de *Escherichia coli* en productos cárnicos, vías fluviales y en muestras clínicas,

no obstante no se ha comprobado algún patotipo en vegetales. Sin embargo, se reconoce que los patotipos más frecuentes en nuestro país son: EHEC (carnes), EPEC (muestras clínicas), EIEC, ETEC, EPEC (vías fluviales).

Por otro lado, Marrero et al., (2020) realizó en Chile un muestreo en un total de 80 vegetales, de los cuales en 43 hubo presencia de *E. coli*, presentando mayor cantidad en muestras de cilantro. Mediante PCR se identificó en 30 aislamientos el gen *elt* perteneciente al patotipo ETEC, a pesar de que los resultados de este estudio no concuerdan con los obtenidos, es posible que sea por el gen de virulencia usado para la identificación del patotipo, ya que en nuestro estudio no se evidenció la presencia de ETEC. Por el contrario, Toe et al., (2018) realizó un estudio en Costa de Marfil aislando un total de 436 cepas de *E. coli* obtenidas de ensaladas crudas, en las cuales se pudo evidenciar los patotipos ETEC, EPEC, STEC, EAEC, siendo los genes de virulencia de EAEC y ETEC los que mayor frecuencia tuvieron, lo cual concuerda con los resultados obtenidos de nuestra investigación, ya que existió la presencia del gen de virulencia del patotipo EAEC en los aislados vegetales, aunque también se evidenció la presencia del gen perteneciente a EHEC.

### **Identificación del gen *fliC***

En la presente investigación se estudió los genes de virulencia del patotipo EHEC O157:H7, en el cual no hubo presencia del serotipo O157, sin embargo, se comprobó la existencia del antígeno flagelar H7. Ocho muestras de diferentes vegetales presentaron el serotipo H7. Según Tschäpe y Fruth, (2001) reafirma que los flagelos del gen *fliC* son responsables de la unión de EHEC a las hojas verdes, permitiendo la interacción de la planta con la bacteria. Los resultados obtenidos concuerdan con la investigación, demostrando que el gen flagelar H7 es común encontrar en plantas de hojas verdes. Los datos revelaron la presencia en cepas aisladas de perejil, cilantro y lechuga corroborando que H7 se adhiere con facilidad a este tipo de vegetales, demostrando que el lavado simple no elimina la bacteria. Según Rodríguez, (2002) confirma que el antígeno H7 no solo pertenece al serotipo O157, también está presente en otros, tales como: ETEC O27, O85, EIEC O124, EPEC O55, STEC O2, O45, O23, O104, O111.

Por otro lado, Xicohtencatl-Cortes et al., (2009) comprobó la función que cumple el flagelo dentro de hospederos animales, revelando que H7 está involucrado en la unión a la células intestinales y a las proteínas del huésped, permitiendo la colonización de la

bacteria para la producción de toxinas. Aquí radica la importancia de haber encontrado colonización con cepas que producen esta variante del serotipo flagelar.

En Ecuador no existen investigaciones que demuestren que la cepa O157:H7 se encuentra en vegetales, no obstante, Arrobo y Zurita, (2017); y Bastidas, (2018) demostraron que la cepa O157:H7 se encuentra en productos cárnicos procedentes de los mercados en la ciudad de Quito, confirmando así la circulación de este, a poca distancia de la ciudad de Ibarra. Otros estudios realizados en Cartagena, Colombia por Astrith et al., (2013) y Jiménez et al., (1977) y en Argentina por Roldán et al., (2007) demostraron también la presencia de este patotipo en carnes comercializadas en mercados.

En la actualidad el aumento de brotes causadas por *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 ha aumentado y se asocia principalmente con el consumo de vegetales crudos, ya que están más propensos a la contaminación microbiana. Estudios realizados en vegetales de tipo hoja por NandaKafle et al., (2018); Wright et al., (2017) y Torres-Aguilar et al., (2015), comprueban que *E. coli* O157:H7 mediante la internalización penetra los tejidos internos colonizando a la planta completamente, además confirman que después del lavado la bacteria sobrevive y se encuentra en condiciones óptimas para una infestación.

#### **Identificación del gen *astA*.**

En el presente estudio se logró identificar 18 cepas que portan el gen *astA*, las muestras de perejil mostraron mayor presencia del gen, sin embargo, no existen investigaciones que corroboren la presencia del gen en aislados en muestras vegetales. Un estudio relacionado con un brote en estudiantes de 12 y 15 años en Japón, demostró la presencia del gen en el agua de potable. Yatsuyanagi et al., (2003) muestreo a 75 estudiantes de los cuales 41 dieron positivo para cepas portadoras del gen. Por este motivo, es posible que la presencia del gen *astA* en nuestro estudio sea por la contaminación del agua que se utiliza en las hortalizas.

Sin embargo, este gen se ha detectado en cepas de *E. coli* aisladas de cerdos posterior al destete, en muestra de bovinos, en órganos internos de aves de corral, demostrando su presencia en animales y posiblemente en el ambiente. (Janßen et al., 2001; Osek, 2002; y Pizarro et al., 2013).

Un estudio realizado en Taiwán por Tsai et al., (2003) caracterizó cepas de EAEC, en el cual procesaron un total de 403 cepas de las cuales 63 eran aislamientos de laboratorios y 340 aislados clínicos y no pudieron evidenciar la presencia del gen *astA*, sin embargo, comprobaron la existencia de otro gen de virulencia (*aggA*) perteneciente a este patotipo. Por otro lado, Paiva De Sousa y Dubreuil, (2001) estudiaron la distribución y expresión del gen *astA* en 358 aislamientos bacterianos pertenecientes a Enterobacterias aisladas de humanos y evidenció la presencia de este gen en 71 cepas de *E. coli* (EPEC, EAEC, EHEC, ETEC) y en 5 cepas de *Salmonella spp.* Este estudio demuestra que el gen *astA* está presente en otras bacterias y no solamente se encuentra en el patotipo enteroagregativo. Del mismo modo Soto et al., (2009) hizo una comparación de 170 aislamiento clínicos con 35 cepas de control para determinar la presencia del gen *astA*, demostrando la presencia del gen en 8 cepas de *E. coli* uropatógena.

Estos estudios demuestran que el gen *astA* está presente en diferentes patotipos de *Escherichia coli* y además en otras bacterias; sin embargo, no se encontró evidencia de su existencia en aislados de vegetales, pero si en aguas de riego, por lo que se puede considerar que es una vía de contaminación para que los alimentos presenten este gen.

### **Producción de biopelículas en *Escherichia coli***

En la actual investigación se analizó la capacidad de formación de biopelícula en 29 muestras de *Escherichia coli* a temperaturas de 30 y 37°C. Se evidenció que 19 cepas tuvieron la capacidad de formar biopelículas a una temperatura de 30°C, mientras que, a 37°C no se confirmó la formación de está. Beloin et al., (2008); y Telléz, (2010) afirman que *E. coli* es una especie predominante entre las bacterias anaerobias facultativas, y se ha demostrado que proporciona mayor resistencia a desinfectantes alimenticios, haciendo que la bacteria sea más difícil de eliminar. Por ese motivo, Naves, (2010) afirma que algunas cepas de *E. coli* tienen la capacidad de causar infecciones extraintestinales y se relaciona con factores de virulencia entre los cuales destaca la formación de biopelículas. Un estudio realizado por (Amrutha et al., 2017) en aislados de superficies de frutas y verduras con un total de 53 cepas; 35 de *E. coli* y 18 de *Salmonella sp*, realizaron ensayos en microplacas y confirmaron que el 75% de aislamientos de cada bacteria tienen la capacidad de formar biopelícula fuerte y son potencialmente virulentas.

Además, Uhlich et al., (2008) realizó una investigación en cepas aisladas de *Escherichia coli* relacionadas con brotes de verduras frescas (lechuga y espinaca) y demostró que están íntimamente relacionadas, reafirmando que las biopelículas ayudan a la bacteria a persistir en alimentos, superficies sólidas y a la resistencia antimicrobiana; esto confirma los resultados obtenidos en la presente investigación, mostrando que *E. coli* es buena formadora de biopelículas en vegetales frescos..

Por el contrario, Loera-Muro et al., (2016) realizó ensayos en aislados de *Escherichia coli* y *Actinobacillus pleuropneumonia* obtenidos de cerdos. El objetivo de dicha investigación fue determinar la capacidad de *A. pleuropneumonia* para formar biopelículas con otras especies. A pesar de utilizar condiciones favorables para *A. pleuropneumonia*, *E. coli* puede reducir la formación de biopelícula a una temperatura de 37°C, demostrando la competitividad de *E. coli* para sobrevivir en condiciones de estrés.

### **Tipificación para el análisis clonal de cepas de *Escherichia coli***

#### **BOX-PCR**

Se tipificó un total de 29 cepas de *Escherichia coli* obtenidas de diferentes vegetales, utilizando el primer BOX\_A1R. Todas las cepas produjeron patrones de bandas únicas y distintivas. Según Carlos et al., (2012) las técnicas que se usadas para la reacción en cadena de polimerasa hoy en día son las más comunes y son útiles específicamente para la identificación de clones y determinar las fuentes de contaminación fecal en alimentos y aguas, un claro ejemplo es BOX-PCR. Para Mohapatra et al., (2007) es una de las técnicas más adecuadas para la tipificación molecular de especies, mediante la huella digital se puede evaluar la variabilidad genética que posee cada bacteria y analizar su relación clonal mediante la elaboración de un dendrograma. Lee y Wong, (2009) afirman que, para un análisis correcto la resolución de las bandas obtenidas debe ser claras y definidas; por otro lado, es necesario verificar el tipo de gel que se va a utilizar para poder conseguir bandas fuertes, debido a que el tamaño del poro puede intervenir en el análisis de los patrones de bandas.

#### **Dendrograma de *Escherichia coli***

Los resultados obtenidos con la técnica de BOX-PCR fueron analizados mediante el programa BioNumerics v.7 y se construyó un dendrograma UPGMA utilizando el índice numérico de DICE de discriminación. La fórmula de Simpson dio como resultado un índice de 0.66. Hunter y Gaston, (1988) señalan que el cálculo debe aproximarse a 1,

mientras más cerca este de este valor existe mayor clonalidad en las cepas. Este valor se basa en la probabilidad de que existan cepas en la población muestreada relacionadas entre sí, por lo que al momento de realizar el dendrograma, éstas se colocaron en diferentes grupos coloniales. En esta investigación se obtuvo una probabilidad del 66% de que las cepas muestreadas puedan ser clones.

Las 29 cepas de *Escherichia coli* mostraron diferentes patrones de bandas, lo que demuestra que existen diferentes perfiles, determinando así su alta diversidad genética. Se puede observar que las ramas del árbol se agrupan por mercados, es decir, que cada mercado presentaría *E. coli* de distinto origen, demostrando que no existe una sola fuente de contaminación. Por otro lado, Dombek et al., (2000) realizó una investigación de tipificación en aislados de *Escherichia coli* obtenidos de animales (gansos, vacas, cerdos, ovejas, patos y pollos) y humanos utilizando el primer BOX-A1R, reafirmando que el BOX-PCR es efectivo para tipificar cepas de *E. coli*.

#### **Protocolo de Vigilancia Epidemiológica del serotipo de *Escherichia coli* O157:H7**

Se planteó la elaboración de un protocolo de vigilancia epidemiológica del serotipo de *Escherichia coli* O157:H7, el cuál es aplicable dentro de establecimientos que expende vegetales, es decir, mercados, supermercados, pequeños expendedores y cadenas alimenticias. La propuesta de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y el Instituto de Salud Carlos, (2013), sugiere medidas preventivas, métodos de confirmación de la cepa y los controles que se pueden tomar en caso de posible brote. Finalmente, para el desarrollo del protocolo se tomó diversos puntos importantes, tales como: medidas de prevención, principales reservorios, período de incubación, características de la cepa, vías de transmisión, análisis para la confirmación de la cepa, tomando en cuenta medios específicos que se emplearon durante la investigación, además de otros que proponen Antonio y Nieto, (2010); Astrith et al., (2013); Jure et al., (2015); y Shu y Shu, (2016). Estos medios se han empleado para el aislamiento y posterior identificación mediante PCR. Para el aislamiento de la cepa se ha propuesto usar medios selectivos como Agar MacConkey, y otros medios de verificación como son: pruebas bioquímicas (TSI, TBX, EMB), posteriormente para la sero-tipificación se ha recomendado usar primers específicos tales como: *Stx1*, *stx2*, *eae*, *fliC* y *rfbE* para identificar los genes de virulencia y verificar la presencia de la cepa.

## CAPÍTULO V

### Conclusiones y Recomendaciones

#### 5.1 Conclusiones

- Los vegetales consumidos en los principales mercados de Ibarra están colonizados por diferentes especies de microorganismos, siendo el mercado 1 el que presenta mayor presencia de unidades formadoras de colonias, por otro lado, los vegetales que presentaron mayor UFC son: el perejil y apio.
- Según los resultados obtenidos, en los diferentes vegetales analizados, el mercado 2 tuvo más presencia de *Escherichia coli* en vegetales tipo hoja como son: el apio y perejil con un total de 6 muestras cada uno.
- En el estudio se evidenció que la mayor cantidad de genes de virulencia, se encuentran en el mercado 2, se reveló que las muestras de perejil presentan mayor cantidad de cepas portadoras de los genes de virulencia *fliC* y *astA*, demostrando una potencial fuente para la producción de enfermedades gastrointestinales.
- La investigación reveló que existe la posible presencia de *Escherichia coli* enteroagregativa, sin embargo, no se pudo evidenciar la presencia de cepas de *Escherichia coli* verotoxigénica ni de otros patotipos en los vegetales de estudio.
- Existe una alta presencia de *Citrobacter freundii* en muestras de tomate, especialmente los provenientes del mercado 3.
- Los aislados ambientales de *Escherichia coli* obtenidos de los principales mercados tienen la capacidad de producir biopelículas en condiciones de estrés, como crecimiento con limitación de nutrientes y temperatura de 30°C.
- Los aislados de *Escherichia coli* según el análisis de tipificación presentan una importante diversidad genética. Esto nos demuestra que las cepas aisladas de los vegetales de estudio tienen diferente origen.

#### 5.2 Recomendaciones

- De acuerdo con los resultados obtenidos en la investigación y después de revelar la presencia de diferentes microorganismos en las muestras de los vegetales, se recomienda realizar un muestreo exhaustivo con el fin de identificar el origen de la contaminación. Por otro lado, se recomienda a los expendedores mejorar el manejo de alimentos en los mercados de Ibarra para evitar la presencia de microorganismos.
- Otro de los parámetros que se debe considerar para verificar la presencia de microorganismos, es realizar análisis en otro tipo de hortalizas que diariamente se consumen crudas, para comprobar la presencia o ausencia de bacterias; también se sugiere, analizar vegetales tipo bulbo.
- A partir de esta investigación se recomienda emplear diferentes pruebas específicas para comprobar la presencia de bacterias, pueden ser: pruebas químicas mediante medios cromogénicos y pruebas moleculares mediante primers específicos para verificar la presencia de *Escherichia coli*.
- Se sugiere futuras investigaciones para identificar bacterias que se encontraron en los resultados de esta investigación utilizando pruebas específicas para: *Acinobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lelliottia*, *Pantoea*, *Raoultella*, *Serratia*; ya que provocan enfermedades de origen alimentario.
- Con los resultados obtenidos en la investigación, y después de evidenciar la presencia del gen flagelar H7, se recomienda a futuras investigaciones identificar el serotipo del antígeno somático O y conocer al patotipo al cual pertenece.
- El análisis realizado en la investigación se limitó en la presencia o ausencia de genes de virulencia presente en ciertos patotipos, sin embargo, para futuras investigaciones sería importante realizar la secuenciación para evidenciar la presencia de los genes de virulencia propios de cepas de *E. coli* extraintestinales, así como identificar clones epidemiológicos.

- Se recomienda poner en práctica un piloto que evalúe y valide la efectividad del protocolo de vigilancia sugerido aquí, así como proponer una alianza estratégica entre la academia y el Gobierno Autónomo en beneficio de la comunidad.
- Se sugiere a las autoridades municipales que están encargadas del saneamiento de mercados, fijar objetivos y días en el calendario para realizar la limpieza de los mercados, monitorear los alimentos que se expenden en los establecimientos y llevar a cabo estudios que investiguen la calidad microbiológica.

## Bibliografía

- Abdul, U., Beuchat, L., & Ammar, M. (1993). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 1999–2006.
- Adegun, B. R., Oluduro, A. O., & Aregbesola, O. A. (2019). Isolation and molecular characterization of citrobacter species in fruits and vegetables sold for consumption in ILE-IFE, Nigeria. *Scientific African*, 6, e00173.  
<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00173>
- Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica. (2011). Análisis microbiológico de los alimentos. *Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos*, 8–9.  
[http://www.anmat.gov.ar/renalao/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_Vol\\_I.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renalao/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf)
- Agropecuaria, I. C. N. (2000). *III Censo Nacional Agropecuario 2000*.
- Al-Jaboobi, M., Bouksaim, M., Tijane, M., & El-Ariqi, S. (2013). Agricultural quality evaluation of wastewater, used in yemen vegetables production. *Middle East Journal of Scientific Research*, 16(5), 667–677.  
<https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.16.05.11031>
- Alemu, G., Mama, M., & Siraj, M. (2018). Bacterial contamination of vegetables sold in Arba Minch Town, Southern Ethiopia. *BMC Research Notes*, 11(1), 1–5.  
<https://doi.org/10.1186/s13104-018-3889-1>
- Algorta, G. (2014). *Bacilos Gram Negativos No Exigentes Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonas*. 14. <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 22.pdf>
- Amrutha, B., Sundar, K., & Shetty, P. H. (2017). Study on *E. coli* and *Salmonella* biofilms from fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1091–1097. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2555-2>
- Antonio, J., & Nieto, S. (n.d.). *bacteriana en el laboratorio de microbiología*.
- Arrobo, A., & Zurita, A. (2017). *Determinación de la Presencia de Escherichia coli O157:H7 en carne molida de res en mercados municipales de Quito*.  
<http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8982/1/UDLA-EC-TIB-2017-52.pdf>
- Astrith, P., Anaya, F., Marcela, L., Medina, R., Ernesto, M., Ugarriza, O., Ana, L., &

- Gutiérrez, L. (2013). *Determinación de Escherichia Coli e identificación del serotipo O157 : H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena \**. 10(1), 91–100.
- Ausay, E. (2015). Respuesta del tomate riñón (*Lycopersicum esculentum* Mill) Cv Dominic bajo invernadero a dos relaciones nitrato/amonio mediante fertirriego por goteo. In *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (Vol. 1). [http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4264/3/TESIS CRISTINA AUSAY \(2\).pdf](http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4264/3/TESIS%20CRISTINA%20AUSAY%20(2).pdf)
- Bastidas, A. (2018). Determinación de *Escherichia coli* O157:H7 por el método Oficial AOAC 996.09 en carne de res faenada, proveniente de la empresa metropolitana de rastro de Quito [Universidad Central del Ecuador]. In *Repositorio-UCE* (Issue 4). <https://doi.org/10.1590/s1809-98232013000400007>
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. (2008). *Escherichia coli* biofilms - *Samenvatting*. 249–289.
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., Ben Slama, K., & Torres, C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023>
- Bhavnani, D., De Los Ángeles Bayas, R., Lopez, V. K., Zhang, L., Trueba, G., Foxman, B., Marrs, C., Cevallos, W., & Eisenberg, J. N. S. (2016). Distribution of enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* across space and time in northwestern Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(2), 276–284. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0337>
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M. P., Gonza, E. A., Berna, M. I., & Blanco, J. (2004). Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing. *Society*, 42(2), 645–651. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.645>
- Blanco, Miguel, Padola, N., Krüger, A., Sanz, M., Blanco, J., González, E., Dahbi, G., Mora, A., Bernárdez, M. I., Etcheverría, A., Arroyo, G., Lucchesi, P., Parma, A., & Blanco, J. (2004). Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International*

*Microbiology*, 7(4), 269–276.

Bordenave, A. (2018). *Control microbiológico de lechugas*. <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L1RyYWJham9zX1By4WN0aWNvcy9UUF9DT05UUk9MX01JQ1JPQklPTE9HSUNPX0RFX0xFAQ0hVR0FTLnBkZg%3D%3D&cidReset=true&cidReq=MICROALIMENT>

Boyce, T., Swerdlow, D., & Griffin, P. (2000). Current Concepts. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 29(3), 167–180.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9490147>

Brandl, M. T. (2008). Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5285–5289. <https://doi.org/10.1128/AEM.01073-08>

Cahuasqui, S. (2011). *Determinación de metales pesados (plomo, cadmio y níquel) en el cilantro (Coriandrum sativum L) en Aloag, cantón Mejía, provincia de Pichincha por espectrofotometría de absorción atómica de llama* [Universidad Católica del Ecuador].  
[http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12765/CARATULA DISERTACION.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12765/CARATULA%20DISERTACION.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Cajas, J., & Cobos, J. (2015). *UNIVERSIDAD DE CUENCA*. Universidad de Cuenca.

Carlos, C., Alexandrino, F., Stoppe, N. C., Sato, M. I. Z., & Ottoboni, L. M. M. (2012). Use of *Escherichia coli* BOX-PCR fingerprints to identify sources of fecal contamination of water bodies in the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Environmental Management*, 93(1), 38–43.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.08.012>

Carmona, M. (1997). *escherichia coli*.

Castillo, A. M. (2015). *Movilidad de factores de virulencia del patógeno E . coli O157 : H7 y otros serotipos Memoria presentada por*. Universidad de Barcelona.

Castro-alarcón, N., Alonso-morales, A., Silva-sánchez, J., & Armenta-solís, A. (2009). *para la tipificación molecular de aislados de Enterobacter cloacae productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. 4*, 165–174.

Centro Nacional de Epidemiología. (2011). *BROTE DE ESCHERICHIA COLI*.  
<http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/306/322>

- Chango, S., & LLano, S. (2017). *Enfermedades diarreicas en niños menores de cinco años que acuden al Centro de Salud Urbano Satelital de la ciudad del Tena, en el periodo enero 2015 a mayo 2017* [Universidad Central del Ecuador].  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/11917/1/T-UCE-0006-003-2017.pdf>
- Colomer, M., & García, A. (2011). *Transferencia genética horizontal en Escherichia coli patógenas*. Grupo MARS (Microbiología de Aguas Relacionada Con La Salud).  
<https://doi.org/https://www.semicrobiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semaforo/52/articulos/SEM-52%2015.pdf>
- Cuenca, D. (2015). *PRODUCCIÓN DE CULANTRO , ( Coriandrum sativum L . ) EN SUELOS PESADOS EN LA GRANJA EXPERIMENTAL SANTA INÉS , COMO MATERIA* [Universidad Técnica de Machala].  
[http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11113/7/CD330\\_TESIS.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11113/7/CD330_TESIS.pdf)
- Deker, I. (2011). *UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL TESIS DE GRADO Previo a la obtención del título de*. Universidad de Guayaquil.
- Díaz, L., Martínez, J., Morales, M., & Urbano, J. (2014). *INCIDENCIA DE LA BACTERIA ESCHERICHIA COLI (O157-H7) EN LOS CANALES DE REGADÍO DE CHUQUITANTA EN EL AÑO 2014*.  
[https://www.academia.edu/10339639/Incidencia\\_de\\_la\\_b.\\_E\\_coli\\_en\\_los\\_canales\\_de\\_regadio\\_de\\_chuquitanta](https://www.academia.edu/10339639/Incidencia_de_la_b._E_coli_en_los_canales_de_regadio_de_chuquitanta)
- Dombek, P. E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T., & Sadowsky, M. J. (2000). Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate Escherichia coli isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2572–2577. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2572-2577.2000>
- Doyle, M. P. (1991). Escherichia coli O157: H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 12(4), 289–301.  
[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90143-D](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90143-D)
- Elvira Farfán-García, A., & Catherine Ariza-Rojas. (2014). mechanisms of enteropathogenic Escherichia coli. *Biotecnologia*, 33(4), 13.
- Epidemiología, C. N. de, & Instituto de Salud Carlos, I. (2013). Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Red Nacional de Vigilancia*

- Epidemiológica*, 341–360.  
<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/07/2015-28724e36ba>
- Ercibengoa, M., & Alonso, M. (2018). Future Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. In *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814451-0.00017-4>
- FAO/OMS. (2004). *Documento De Debate Sobre El Perfil De Riesgos Para Escherichia Coli Enterohemorrágica, Incluida La Identificación De Los Productos Básicos De Interés, Entre Ellos Las Semillas Germinadas Y La Carne Molida De Res Y Puerco*. 10(1).
- FAO/OMS. (2018). *Control de la Escherichia coli productora de toxina Shiga (ECTS) en la carne de bovino, la leche no pasteurizada y el queso a base de leche no pasteurizada, las hortalizas de hoja verde y las semillas germinadas*. 13.  
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh->
- FAO. (2011). *Prevención de E.coli en Alimentos*.  
[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Preventing\\_Ecoli\\_es.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf)
- FDA. (2019). *Bacteria and Virus*. <https://espanol.foodsafety.gov/food-poisoning/bacteria-and-viruses#e-coli>
- Fernández Cuenca, F., López Cerero, L., & Pascual Hernández, Á. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(SUPPL.1), 20–25.  
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70110-1](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70110-1)
- Fernando, N., & Francisco, A. M. M. (2002). Cartas al director. *Revista de Ortopedia y Traumatología*, 46(SUPPL. 1), 76–77.
- Food and Drug Administration. (1997). *Directivas para la Industria: Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, para Frutas y Hortalizas Frescas*. 50.  
<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/UCM186594.pdf>
- García, A. (2001). *El cultivo de la Lechuga* [Universidad Técnica de Babahoyo].

<http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/143/10/T-UTB-FACIAG-AGR-000039.03.pdf>

García, C., García, J., & Rodríguez, J. (2017). Enfermedades transmitidas por el agua y saneamiento básico en Colombia. *Revista de Salud Pública*, 18(5), 738.

<https://doi.org/10.15446/rsap.v18n5.54869>

García, R., Chávez, J., Mejía, A., & Durán, C. (2002). Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(1), 24–30.

Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 3–30.

<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>

Gómez-Govea, M., Solís-Soto, L., Heredia, N., García, S., Moreno, G., Tovar, O., & Isunza, G. (2012). Analysis of microbial contamination levels of fruits and vegetables at retail in Monterrey, Mexico. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(1), 152–156.

González Ardón, O., Montes, F., Mayorga, A., & Letelier, M. (1982). Infección por *Citrobacter freundii*. *Bvsalud*, 9(1), 6–12.

<http://www.bvs.hn/RHP/pdf/1982/pdf/Vol9-1-1982-3.pdf>

González, E. R. (2011). *IDENTIFICACIÓN DE Escherichia coli DIARREOGÉNICAS EN MUESTRAS CLÍNICAS (HECES) Y DE ALIMENTOS EN EL ESTADO DE SINALOA*. 121.

Grant, J., Wendelboe, A. M., Wendel, A., Jepson, B., Torres, P., Smelser, C., & Rolfs, R. T. (2008). Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), 1633–1636.

<https://doi.org/10.3201/eid1410.071341>

Guerrero, C., Guillén, A., & Rojas, R. (2013). *Vigilancia de Escherichia coli O157 : H7 en alimentos y aguas*. 35–45.

Gutiérrez Romero, A. L., Arellano Pimentel, B. E., Gutiérrez Iglesias, C., Escalera Zúñiga, E., Romero Díaz, G. A., Saucedo Constantino, J., González Moreno, J. O., Zamudio Duran, M. de la M., Martínez Flores, M. G., Ortiz de Montellano, M. G.,

- & Flores Cabrera, Y. (2017). *Manual de Laboratorio Microbiología General I*. 184. [https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/19Manual\\_Microbiologia\\_General\\_1.pdf](https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/19Manual_Microbiologia_General_1.pdf)
- Heaton, J. C., & Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere : a review. *Journal of Applied Microbiology*, *104*, 613–626. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x>
- Huapaya, B., T, J. H., M, V. S., Yón, Y. T. De, P, Y. M., L, E. S., M, S. S., Tejada, C., C, C. G., & B, J. G. (2001). *PRIMER AISLAMIENTO DE Escherichia coli O157 : H7 ENTEROHEMORRÁGICA EN EL PERÚ*. *18*, 38–39.
- Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, *26*(11), 2465–2466. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
- Institute for International Cooperation Animal Biologics. (2010). *E. Coli enterohemorrágica*. 1–12. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ecoli-es.pdf>
- Janßen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H. C., & Wieler, L. H. (2001). Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology*, *291*(5), 371–378. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00143>
- Jiménez, M., Chaidez, C., & León, J. (1977). Micro-Organisms in Foods 2: Sampling for Microbiological Analysis; Principles and Specific Applications. *Technometrics*, *19*(2), 221. <https://doi.org/10.2307/1268642>
- Jorge Vidal, A. C.-R., & Javier Gutiérrez Jiménez, F. N.-G. (2007). *Patogénesis molecular , epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena*. *49*(5).
- Jure, M. A., Condorí, M. S., Pérez, G., Catalán, M. G., López, A., Zolezzi, G., Chinen, I., Rivas, M., & Castillo, M. (2015). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Revista Argentina de Microbiología*, *47*(2), 125–131.

- <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.006>
- Kaczmarek, A., Budzy, A., & Gospodarek, E. (2014). *Detection of KI antigen of Escherichia coli rods isolated from pregnant women and neonates*. 419–422. <https://doi.org/10.1007/s12223-014-0315-5>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). *Escherichia coli*. 2(February). <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Konowalchuk, J., Speirs, J., & Stavric, S. (1977). *Cytotoxm of Escherichia*. 18(3), 775–779.
- Lee, A., & Wong, E. (2009). Optimization and the robustness of BOX A1R PCR for DNA fingerprinting using Trout Lake E. coli isolates. *J. Exp. Microbiol. Immunol*, 13(April), 104–113. [http://www.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal\\_ungrad/JEMI/13/13-104.pdf](http://www.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal_ungrad/JEMI/13/13-104.pdf)
- León, A. R. de. (2005). Determinación de [UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA]. In *Proteus*. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2278.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2278.pdf)
- Lindsay, D., & von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64(4), 313–325. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028>
- Lobos, O. (2013). Análisis genético y propiedades virulentas de cepas de. *Revista Chilena De Infectologia*, 30(4), 381–387.
- Loera-Muro, A., Jacques, M., Avelar-González, F. J., Labrie, J., Tremblay, Y. D. N., Oropeza-Navarro, R., & Guerrero-Barrera, A. L. (2016). Auxotrophic *Actinobacillus pleurpneumoniae* grows in multispecies biofilms without the need for nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) supplementation. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0742-3>
- Lorenz, S. C., Son, I., Maounounen-laasri, A., Lin, A., Fischer, M., & Kase, A. (2013). *Prevalence of Hemolysin Genes and Comparison of ehxA Subtype Patterns in Shiga Toxin-Producing Escherichia coli ( STEC ) and Non-*. 79(20), 6301–6311. <https://doi.org/10.1128/AEM.02200-13>
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22(1), 35–45.

<https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>

- Margall, N. (1997). *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública*, 71(5), 437–443. <https://doi.org/10.1590/S1135-57271997000500002>
- Marrero, S., Morales, R., & Holguín, R. (2020). Análisis sobre los Serotipos de E. Coli Asociados con Vegetales Crudos. *Revista Científica*, XXX, 894–898.
- Mateos-Rodríguez, A. P.-G. y F. (2010). *Enterobacterias*. 10(51).
- Mattar, S., Jorge, V., & Arrieta, G. (2001). *E coli 0157 H7 ENTEROHEMORRÁGICO parte 2*.
- Mattar, S., Visbal, J., & Arrieta, G. (2001). *E . coli 0157 : H7 ENTEROHEMORRÁGICO : UN AGENTE ETIOLÓGICO DE DIARREA Y ZOONOSIS EN COLOMBIA SUBESTIMADO . PARTE I*. 6(1), 15–23.
- Ministerio de Salud Pública. (2018). *Vigilancia Epidemiológica*. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/GACETA-GENERAL-S52.pdf>
- Mohapatra, B. R., Broersma, K., & Mazumder, A. (2007). Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 98–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00948.x>
- Montero, D. A., Canto, F. Del, Velasco, J., Colello, R., Padola, L., Salazar, J. C., Martin, C. S., Oñate, A., Blanco, J., Rasko, D. A., Contreras, C., Puente, J. L., Scheutz, F., Franz, E., Vidal, R. M., Arturo, D., Canto, F. Del, Velasco, J., Colello, R., ... Vidal, R. M. (2019). *Cumulative acquisition of pathogenicity islands has shaped virulence potential and contributed to the emergence of LEE-negative Shiga toxin-producing Escherichia coli strains and contributed to the emergence of LEE-negative Shiga toxin-producing*. 1751. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1595985>
- Morales, S., Siu, E., Ramírez, P., & Navarro, A. (2017). Determinación de Serotipos de *Escherichia coli* aisladas de crías de alpacas ( *Vicugna pacos* ) con y sin diarrea en Huancavelica - Determination of *Escherichia coli* serotypes isolated from baby alpacas ( *Vicugna pacos* ) with and without diarrhea in Huancav. *REDVET “Revista Electrónica de Veterinaria,”* 18, 1–14.

- Morin, N., Santiago, A. E., Ernst, R., Guillot, S., & Nataro, J. (2013). Characterization of the AggR Regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 81(1), 122–132. <https://doi.org/10.1128/iai.00676-12>
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., & Diez, F. (2004). Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection*, 67(5), 894–900. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15151224>
- Müller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth, A., Tschäpe, H., & Schmidt, M. A. (2007). Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3380–3390. <https://doi.org/10.1128/AEM.02855-06>
- Muñoz, M. (2017). *Escherichia coli* O157 : H7 en hortalizas de fundos agrícolas en la periferia de la ciudad de Lima - Perú. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
- NandaKafle, G., Christie, A. A., Vilain, S., & Brözel, V. S. (2018). Growth and extended survival of *Escherichia coli* O157: H7 in soil organic matter. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00762>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). *Diarrheagenic Escherichia coli*. 11(1), 142–201.
- Naves, P. L. F. (2010). *Formación de biopelículas por Escherichia coli y su correlación con factores de virulencia : prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas*. Universidad Complutense de Madrid.
- Ocaña de Jesús, R. L., Gutiérrez Ibáñez, A. T., Sánchez Pale, J. R., Mariezcurrena Berasain, M. D., Eslava Campos, C. A., & Laguna Cerda, A. (2018). Persistence, internalization and translocation of *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 and O105ab in plants and tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.12.001>
- Okhuysen, P. C., & DuPont, H. L. (2010). Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance . *The Journal of Infectious Diseases*, 202(4), 503–505. <https://doi.org/10.1086/654895>

- Olaimat, A., & Holley, R. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*, 32(1), 1–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016>
- OMS. (2015). *Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/detail/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- OMS. (2018). *E.coli*.
- ONU. (2019). *Inocuidad de los alimentos*.
- Ortega, D., Barba, P., Mena, S., Espinel, N., & Zurita, J. (2018). Escherichia coli hyperendemic clone ST410-A harboring blaCTX-M-15 isolated from fresh vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador. *International Journal of Food Microbiology*, 280(April), 41–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.037>
- Osek, J. (2002). Genetic relatedness of Escherichia coli O157:H7- strains isolated from pigs determined by random amplification of BOX DNA sequences. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 46(1), 3–10.
- Paiva De Sousa, C., & Dubreuil, J. D. (2001). Distribution and expression of the astA gene (EAST1 toxin) in Escherichia coli and Salmonella. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(1), 15–20. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00097>
- Pérez, D., & Villalobos, G. (2016). Características fisicoquímicas de la saliva de parótida y actividad antimicrobiana-antioxidante de la peroxidasa salival en escolares con gingivitis Physicochemical characteristics and antimicrobial-antioxidant activity salivary peroxidase of parotid sali. *Odous Científica*, 12(2), 15–21. <https://doi.org/10.4321/S1887-85712017000300002>
- Phillips, A. D., Navabpour, S., Hicks, S., Dougan, G., Wallis, T., Frankel, G., & Hospital, R. F. (2000). *Enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 : H7 target Peyer ' s patches in humans and cause attaching / e V acing lesions in both human and bovine intestine*. 377–381.
- Pino, M. (2010). *El cultivo de apio*. Horticultura.

- [http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3353/apio Open.pdf](http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3353/apio%20Open.pdf)
- Pizarro, M. A., Orozco, J. H., Degarbo, S. M., Calderón, A. E., Nardello, A. L., Laciari, A., & Rüttler, M. E. (2013). Virulence profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E.coli* of bovine origin, in Mendoza, Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(4), 1173–1180.  
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000010>
- Prakasan, S., Prabhakar, P., Lekshmi, M., Nayak, B. B., & Kumar, S. (2018). Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring variant Shiga toxin genes from seafood. *Veterinary World*, *11*(3), 379–385.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.379-385>
- Prevention, C. for D. C. and. (2019). *Brotos de Escherichia coli*.  
<https://www.cdc.gov/ecoli/2019-outbreaks.html>
- Ramírez-Castillo, F. Y., Loera-Muro, A., Vargas-Padilla, N. D., Moreno-Flores, A. C., Avelar-González, F. J., Harel, J., Jacques, M., Oropeza, R., Barajas-García, C. C., & Guerrero-Barrera, A. L. (2018). Incorporation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in preformed biofilms by *Escherichia coli* isolated from drinking water of swine farms. *Frontiers in Veterinary Science*, *5*(AUG).  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00184>
- Ramírez, D. (2011). “*Estudio del comportamiento agronómico de tres variedades de Perejil (Petroselinum crispum), sembradas mediante sistema hidropónico con sustrato sólido, en la zona de Babahoyo*”. [Universidad Técnica de Babahoyo].  
<http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/78/6/T-UTB-FACIAG-AGR-000011.pdf>
- Ramírez, L. (2001). *Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48770306*.
- Reporte Técnico de Vigilancia. (2006). *Escherichia coli O157 : H7 . Aspectos generales Enfermedad y agente etiológico Modo de transmisión de la E . coli O157 : H7 Diagnóstico de la enfermedad Diagnóstico clínico* (Issue 2).  
<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/vigilancia/rtv0997.pdf>
- Rev, C. O., Camag, A. M., Garc, O. C., Rodr, H. B., Rodr, H., Argilagos, G. B., & Guirado, O. A. (2017). *Especies bacterianas asociadas a infecciones del tracto urinario Bacterial species associated with urinary tract infections*. *21*(4), 479–486.
- Rincón V, G., Ginestre P, M., Romero A, S., Castellano G, M., & ávila R, Y. (2010).

- Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja. *Kasmera*, 38(2), 97–105.
- Rivas, C., & Mota, M. (1863). *Bacterias anaerobias*. 355–380.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., & Dastek, B. (n.d.). *VOLUMEN I Bacterias de Importancia Clínica*.
- Rivera, M., Rodríguez, C., & López, J. (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(1), 45–48.  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342009000100009&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342009000100009&script=sci_arttext&tlng=en)
- Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E. H., Contreras, C., Rivera, F. P., Mosquito, S., Lluque, Á., & Ochoa, T. J. (2011). Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* Difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 21–28. <https://doi.org/10.1590/s1726-46342011000100004>
- Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Rodríguez, G. (2002a). Metabolismo de nutrientes del *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464–475. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000500011>
- Rodríguez, G. (2002b). *Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli*. 44(5).
- Rojas, D. (2018). *CARACTERIZACIÓN DE Escherichia coli PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA AISLADA DESDE CARNE MOLIDA EN LA CARACTERIZACIÓN DE Escherichia coli PRODUCTORA DE*.
- Rojas Silva, P. (2008). *Estudio de prevalencia y genotificación de Escherichia coli enterotoxigénica aislado en comunidades de Esmeraldas*.
- Roldán, M., Chinen, I., Otero, J. L., Miliwebsky, E. S., Alfaro, N., Burns, P., & Rivas, M. (2007). Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Revista Argentina de*

- Microbiologia*, 39(2), 113–119.
- Salinas, C. (2013). *Introducción De Cinco Variedades De Lechuga* [Universidad Técnica de Ambato].  
[http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6491/1/Tesis-63 Ingeniería Agronómica -CD 204.pdf](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6491/1/Tesis-63%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20204.pdf)
- Samuel, G., & Ree, P. (2006). *Biosynthesis of O-antigens : genes and pathways in v ol v ed in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly*. 338(2003), 2503–2519. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.009>
- Sanchez, A. (2018). *No Title*.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., & Mellmann, A. (2012). *Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature*. 50(9), 2951–2963.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>
- SEBI. (2017). *CONFIDENTIAL Page 1 of 4. December*, 1–5.
- Sendra, N., Tonelli, B., & Alí, S. (2011). *EL cultivo del apio*.  
[http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3353/apio Open.pdf](http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3353/apio%20Open.pdf)
- Sevilla, L. (2013). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. *Tesis*, 1–100.  
<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies*. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), 309–319. <https://doi.org/10.1111/jam.13078>
- Shu, E., & Shu, E. (2016). *Protocolo de vigilancia epidemiológica de Infección por Escherichia Coli*. 1–13.
- Solomon, E., Potenski, C., & Matthews, K. (2002a). *Effect of Irrigation Method on Transmission to and Persistence of Escherichia coli O157 : H7 on Lettuce*. 65(4), 673–676.
- Solomon, E., Potenski, C., & Matthews, K. (2002b). *Effect of irrigation method on transmission to and persistence of Escherichia coli O157:H7 on lettuce*. *Journal of Food Protection*, 65(4), 673–676. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952218>
- Soto, S. M., Guiral, E., Bosch, J., & Vila, J. (2009). *Prevalence of the set-1B and astA genes encoding enterotoxins in uropathogenic Escherichia coli clinical isolates*.

- Microbial Pathogenesis*, 47(6), 305–307.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.09.007>
- Souza, V., Castillo, A., Rocha, M., Sandner, L., Silva, C., & Eguiarte, L. (2001). ECOLOGÍA EVOLUTIVA DE ESCHERICHIA COLI. *SciELO*, 26.  
<https://doi.org/ISSN 0378-1844>.
- Splittstoesser, D. F., Queale, D. T., Bowers, J. L., & Wilkison, M. (1980). Coliform Content of Frozen Blanched Vegetables Packed in the United States. *Journal of Food Safety*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1980.tb00386.x>
- Telléz, S. (2010). *Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria*.  
<https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>
- Toe, E., Dadié, A., Dako, E., Loukou, G., Dje, M. K., & Blé, Y. C. (2018). Prevalence and potential virulence of *Escherichia coli* in ready-to-eat raw mixed vegetable salads in collective catering in Abidjan, Côte d’Ivoire. *British Food Journal*, 120(12), 2912–2923. <https://doi.org/10.1108/BFJ-09-2017-0484>
- Torres-Aguilar, V., Manjarrez-Domínguez, C. B., Acosta-Muñiz, C. H., Guerrero-Prieto, V. M., Parra-Quezada, R. Á., Noriega-Orozco, L. O., & Ávila-Quezada, G. D. (2015). Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y Plantas Comestibles. ¿Se han Desarrollado Mecanismos de Internalización Bacteriana? *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 64–83.  
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1507-4>
- Tsai, C. C., Chen, S. Y., & Tsen, H. Y. (2003). Screening the enteroaggregative *Escherichia coli* activity and detection of the *aggA*, *aafA*, and *astA* genes with novel PCR primers for the *Escherichia coli* isolates from diarrhea cases in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46(3), 159–165.  
[https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00043-9)
- Tschäpe, H., & Fruth, A. (2001). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Contributions to Microbiology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1159/000060396>
- Uhlich, G. A., Sinclair, J. R., Warren, N. G., Chmielecki, W. A., & Fratamico, P. (2008). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with two multistate food-borne outbreaks that occurred in 2006. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1268–1272.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01618-07>

- Van Ha, N. T., Kitajima, M., Hang, N. V. M., Matsubara, K., Takizawa, S., Katayama, H., Oguma, K., & Ohgaki, S. (2008). Bacterial contamination of raw vegetables, vegetable-related water and river water in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Water Science and Technology*, 58(12), 2403–2411. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.435>
- Van Hoek, A. H. A. M., Veenman, C., van Overbeek, W. M., Lynch, G., de Roda Husman, A. M., & Blaak, H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014>
- Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Mota, M. I., González, S., & González, G. (2008). *Detección y caracterización de Escherichia coli productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay*. 1–9.
- Vidal, J. (2003). Escherichia coli enteropatógena ( EPEC ): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud En Tabasco*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48709108>
- Villalobos, L. B. (2008). *Detección molecular de Escherichia coli productor de shiga toxina ( Stx1 ) y rotavirus en heces de niños con diarrea* . 49(0157), 387–395.
- Vilte, D. (2015). *Evaluación de proteínas de una isla de patogenicidad y de envolturas bacterianas de Escherichia coli O157:H7 como vacunas para reducir su incidencia en bovinos* [Universidad de Buenos Aires-UBA]. <https://core.ac.uk/download/pdf/148073076.pdf>
- Wachtel, M. R., Whitehand, L. C., & Mandrell, R. E. (2002). Association of Escherichia coli O157 : H7 with Preharvest Leaf Lettuce upon Exposure to Contaminated Irrigation Water. *Journal of Food Protection*, 65(1), 18–25. <https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-65.1.18>
- Wang, L. E. I., Rothemund, D., Curd, H., & Reeves, P. R. (2006). *Sequence Diversity of the Escherichia coli H7 fliC Genes : Implication for a DNA-Based Typing Scheme for E . coli O157 : H7*. 38(5), 1786–1790.
- Watanabe, Y., Ozasa, K., Mermin, J. H., Griffin, P. M., Masuda, K., Imashuku, S., & Sawada, T. (1999). Factory outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection in Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 5(3), 424–428. <https://doi.org/10.3201/eid0503.990313>

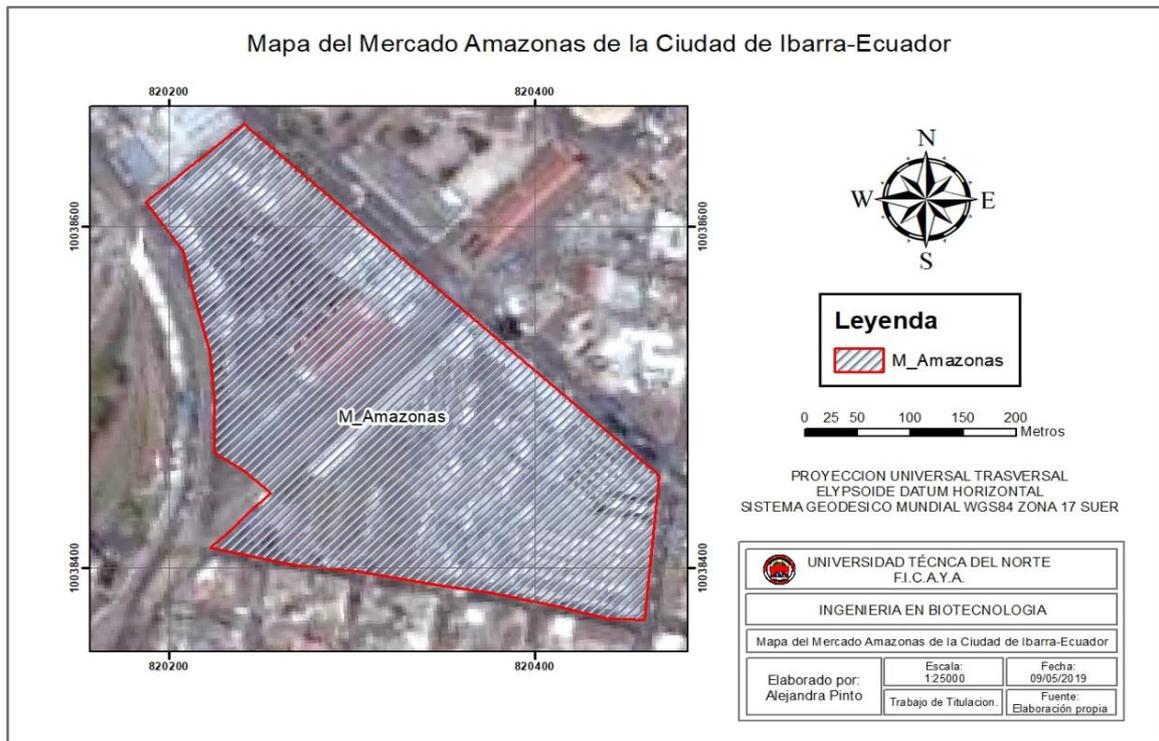
- Wright, K. M., Crozier, L., Marshall, J., Merget, B., Holmes, A., & Holden, N. J. (2017). Differences in internalization and growth of *Escherichia coli* O157:H7 within the apoplast of edible plants, spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*. *Microbial Biotechnology*, *10*(3), 555–569. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12596>
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Saldaña, Z., Ledesma, M. A., Puente, J. L., & Girón, J. A. (2009). The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *Journal of Bacteriology*, *91*(1), 411–421. <https://doi.org/10.1128/JB.01306-08>
- Yatsuyanagi, J., Saito, S., Miyajima, Y., Amano, K. I., & Enomoto, K. (2003). Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(5), 2033–2039. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2033-2039.2003>
- Yousuf, O., Alam, I., Bhat, M. I., & Titikshya, S. (2018). Assessment of microbial spoilage and techniques to avert the deterioration in fruits and vegetables. *International Journal of Chemical Studies*, *6*(3), 2230–2235. [https://www.researchgate.net/publication/328637816\\_Bacterial\\_contamination\\_of\\_vegetables\\_sold\\_in\\_Arba\\_Minch\\_Town\\_Southern\\_Ethiopia](https://www.researchgate.net/publication/328637816_Bacterial_contamination_of_vegetables_sold_in_Arba_Minch_Town_Southern_Ethiopia)
- Zárate, M. S., Romano, V., Nievas, J., & Smayevsky, J. (2014). Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Revista Argentina de Microbiología*, *46*(2), 98–102. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70055-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70055-0)
- Zboromyrska, Y. (2014). Aplicaciones del MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología. *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*, *20*, 87–98.
- Zou, L., Meng, J., Mcdermott, P. F., Wang, F., Yang, Q., & Cao, G. (2014). Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. 1–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dku197>

## Anexos.

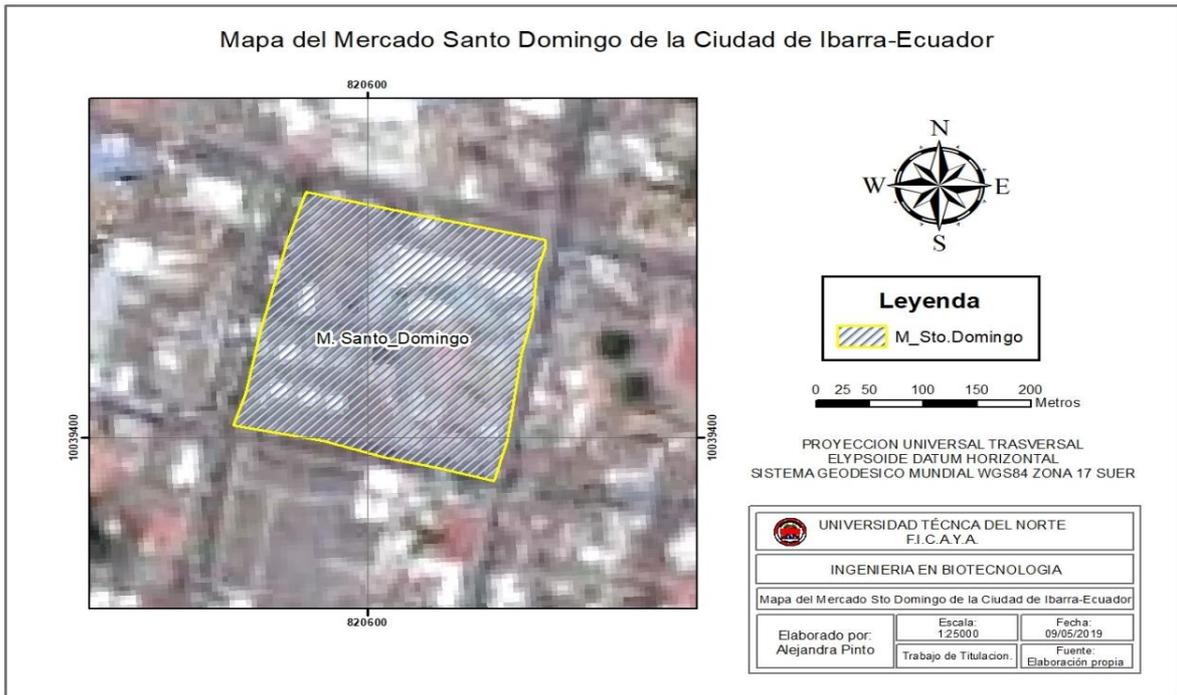
Anexo 1.- Mapa del mercado 1 estudiado en la ciudad de Ibarra



Anexo 2.- Mapa del mercado 2 estudiado en la ciudad de Ibarra



Anexo 3.- Mapa del mercado 3 estudiado en la ciudad de Ibarra



Anexo 1.-Medios usados para aislar *Escherichia coli*.

<b>Medios sólidos</b>	<b>Medios Líquidos</b>
<p><b>Agar MacConkey (BD™®)</b> Medio de diferenciación selectivo, que se usó para el aislamiento de <i>Escherichia coli</i>.</p> <p><b>Eosin Methylene Blue Agar</b> Medio selectivo, el cual se usó para la confirmación de cepas de <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p><b>Agua de peptona (Liofilchem®)</b> Medio no selectivo, se usó para desprender las bacterias de los vegetales de estudio.</p> <p><b>Tryptic Soy Broth (Liofilchem®) TSB</b> Medio de enriquecimiento, que se usó para el congelamiento de cepas.</p>

Anexo 2.-Etiqueta para reconocimiento de cajas Petri

<b>Etiqueta de las cajas petri</b>	
<b>Primera letra → Mercado</b>	Amazonas, Mayorista, Santo Domingo
<b>Segunda letra → Tipo de Vegetal</b>	Apio, Culantro, Lechuga, Pimiento, Perejil, Tomate.
<b>Número → Hace referencia al muestreo</b>	En total se hicieron 3 muestreos en cada mercado
<b>Tercera letra → Inicial del Medio</b>	Agar MacConkey
<b>Número → Representa la dilución</b>	Dilución 1 → 0.1, Dilución 2 → 1, Dilución 3 → 10
<b>Cuarta letra → hace referencia a la colonia aislada</b>	

Anexo 3.-Caja Petri etiquetada



Nombre del Mercado Muestreado

Número de Muestreo

Número de dilución

Inicial del medio

Nombre del Vegetal Muestreado



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Protocolo de Vigilancia epidemiológica de infección por *Escherichia coli* productora de toxina *shiga* o vero (STEC), cepa O157:H7**

**Introducción**

*Escherichia coli* pertenece a la familia de las Enterobacterias, es un anaerobio facultativo que forma parte de la microbiota humana y también se encuentre en animales de sangre caliente, posee más de 700 serotipos de los cuales: 187 pertenecen al antígeno O (somático), 75 al H (flagelar) y 103 al K (capsular), optando la bacteria combinarse de diferente manera para la creación de patotipos.

Los patotipos que comúnmente ocasionan infecciones intra-intestinales son: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) y enterohemorrágica (EHEC). Dentro del grupo de las enterohemorrágicas se encuentra la cepa O157:H7 que se lo cataloga como uno de los agentes infecciosos potenciales de mayor importancia, se caracteriza por la producción de toxinas Shiga-like tipo vero provenientes de *Shigella* sp. La adquisición de genes de virulencia ocurre mediante transferencia horizontal, esto permite que la bacteria mute y adquiera virulencia.

**Reservorios de EHEC O157:H7**

El principal reservorio de EHEC O157:H7 es el tracto intestinal del ser humano y animales de sangre caliente. Por otra parte, los alimentos que pueden estar implicados con la contaminación son:

Vegetales → Lechuga, Tomate, Pimiento, Culantro, Perejil, entre otros.

Carnes → Bovinos, Equinos, Caprinos, entre otros.

Productos enlatados o fermentados → jugos de manzana y embutidos.

Productos lácteos → queso, manteca, leche entre otros.

### **Periodo de incubación**

El período de incubación, después de ingerir los alimentos contaminados con EHEC, puede variar entre tres a ocho días.

### **Características de EHEC O157:H7**

- Bacilo facultativo Gram negativo.
- No fermenta sorbitol.
- No posee actividad de  $\beta$ -glucoranidasa.
- La temperatura óptima de crecimiento varía entre los 30°C – 42°C.
- Sobrevive a temperaturas de -20°C
- Posee resistencia a los cambios de pH (4.4).
- Posee un antígeno flagelar H7.
- Dosis infecciosa de menos de 15 células.
- Posee varios factores de virulencia como: la isla de patogenicidad (PAI), el locus de eliminación del enterocito (LEE), adhesinas, intimina, chaperones, un sistema de secreción tipo III y varias proteínas secretadas como Tir.

### **Vías de transmisión**

- La infección por EHEC se produce por el consumo de carnes poco cocidas.
- La transmisión de persona-persona se produce en centros médicos, en hogares.
- La fuente de abono a base de estiércol de ganado usado en cultivos de plantas.
- Agua contaminada usada para el riego de cultivos.
- Vegetales y frutas.

### **Cuadro clínico de EHEC O157:H7**

Los síntomas provocados por EHEC empiezan con calambres abdominales que pueden ir acompañado de fiebre y vómito que pueden ser controlados a tiempo, pero si el paciente no es atendido puede empeorar produciendo una enfermedad mortal conocida como el síndrome urémico hemolítico (SHU), se caracteriza por presentar complicaciones; trombocitopenia (disminución de la cantidad de plaquetas), anemia hemolítica (disminución de la masa de glóbulos) insuficiencia renal aguda (los riñones dejan de funcionar), hasta llegar a la muerte.

## **Vigilancia para EHEC O157:H7**

### **Objetivo**

Identificar el patrón de distribución de *Escherichia coli* O157:H7 productora de toxina Shiga dentro de vegetales comercializados en los mercados.

### **Importancia**

El protocolo de vigilancia permitirá obtener información necesaria para el control de las enfermedades que se transmiten mediante el consumo de alimentos contaminados, con el fin de controlar la difusión de la infección en otros individuos. Este documento permitirá establecer medidas alternativas de prevención para evitar brotes.

### **Medidas en caso de un brote**

#### **Observación**

Se deberá analizar los casos notificados por cualquier fuente de información. Los casos sospechosos deberán ser estudiados por un Laboratorio Epidemiológico, se comprometerán en la investigación y aportarán información detallada sobre el caso. El Laboratorio realizará los estudios pertinentes para la comprobación. En caso de brote, la Red de Vigilancia Epidemiológica enviará un informe final notificando la existencia y el origen del brote.

#### **Fase de laboratorio.**

Recolección de la muestra.

Aislamiento de *E. coli* en medio MacConkey.

Confirmación de *E. coli* mediante pruebas bioquímicas.

Identificación de la cepa.

Detección medios de cultivo cromogénicos y mediante PCR para los genes stx1 y/o stx2, para la confirmación de la producción de la toxina sigA like

Confirmación molecular de los genes de virulencia *fliC* (O157) y *rfbE* (H7) para la confirmación de la cepa O157H7.

#### **Confirmación epidemiológica del brote**

Transmisión de persona a persona: mediante una persona que ha tenido contacto con un caso confirmado por laboratorio.

Exposición a una fuente común: persona que ha estado expuesta a la misma fuente común o vehículo de infección que un caso confirmado.

Transmisión de animal a persona: persona que ha tenido contacto con un animal infectado confirmado por laboratorio.

Exposición a alimentos o agua contaminados: persona que ha consumido alimentos contaminados o productos tal vez contaminados procedentes de un animal infectado o colonizado confirmado por el laboratorio.

Exposición medio ambiental: persona que se ha bañado en agua o ha tenido contacto con una fuente ambiental contaminada confirmada por el laboratorio.

### **Medidas en caso de brote**

En caso de que la vía de transmisión sean los alimentos, se deberá emitir un informe para desechar los alimentos implicados y evitar la propagación del brote.

En caso de que la vía de transmisión sea el agua, se emitirá una notificación para evitar su consumo y la propagación de la infección.

### **Medidas de control ante un caso y expuestos**

En la fase aguda de la enfermedad es necesario que los afectados no manipulen alimentos de origen vegetal y animal, tampoco pueden tener contacto con niños u otros enfermos mientras no se hayan realizados los análisis correspondientes.

Desinfectar adecuadamente los objetos cercanos a la persona afectada.

Alejar a las personas que presenten cuadros de diarrea de la manipulación de alimentos o de los niños mientras no cese la enfermedad o se hayan realizado los análisis correspondientes.

### **Medidas preventivas**

Controlar las actividades de obtención, iniciando desde el procesamiento, transporte, venta y uso de los alimentos en cualquier establecimiento.

Colocar los productos en envases adecuados que estén libres de impurezas, separar los alimentos cocidos de los que no lo estén.

Mantener una adecuada limpieza de manos en especial después de manipular animales domésticos o de granja, ir al baño o relacionados.

Lavar adecuada y cuidadosamente los alimentos antes de ingerirlos, en especial aquellos que se consuman directamente como frutas y verduras.