

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* EN MUESTRAS DE CARNE DE POLLO QUE SE EXPENDEN EN EL CANTÓN AMBATO

*MOLECULAR IDENTIFICATION OF THE *ESCHERICHIA COLI* BACTERIUM IN SAMPLES OF CHICKEN MEAT THAT ARE SPENT IN THE AMBATO CANTON*

María Barros Iza^{1*}

¹ Tesista, Departamento Medicina Veterinaria, Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8831-9398>. Correo: mbarros0816@uta.edu.ec

Solange Escobar Aguilar²

² Tesista, Departamento Medicina Veterinaria, Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5864-9034>. Correo: sescobar6118@uta.edu.ec

Jennifer Gómez Usiña³

³ Tesista, Departamento Medicina Veterinaria, Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-7157-6739>. Correo: jgomez3741@uta.edu.ec

Carolina Manzanilla Miranda⁴

⁴ Tesista, Departamento Medicina Veterinaria, Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-9956-3784>. Correo: cmanzanillas2073@uta.edu.ec

Sandra Cruz Quintana⁵

⁵ Docente, Departamento Medicina Veterinaria, Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8510-1294>. Correo: sm.cruz@uta.edu.ec

* Autor para correspondencia: mbarros0816@uta.edu.ec

Resumen

La carne de pollo es una de las proteínas de mayor consumo humano a nivel mundial, sin embargo, es uno de los principales reservorios de *Escherichia coli* la cual es la causante principal de múltiples infecciones después

de su consumo debido a diferentes factores como el ineficiente manejo al momento del sacrificio, mala higiene e inadecuada refrigeración. Las enfermedades que causa no solo afecta a la salud de los consumidores, sino también a la economía de los comerciantes. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo identificar por medio de la secuenciación del gen 16S rRNA diferentes cepas que fueron aisladas en la carne de pollo, para esto se tomó 135 muestras que fueron recolectadas en puntos de expendio formales e informales y de 9 centros de faenamiento que suministran al Ambato. Las muestras fueron evaluadas por medio de pruebas microbiológicas y bioquímicas para posteriormente extraer el ADN, de las 40 muestras sospechosas, las mismas fueron analizadas a través de PCR. Los resultados se obtuvieron a través de la secuenciación en donde se identificó un total de 33 cepas diferentes, las cepas AF1 y ATCC 11775 fueron predominantes en las muestras de carne de pollo en el cantón Ambato.

Palabras clave: carne de pollo; cepas; contaminación; *Escherichia coli*; gen 16S rRNA.

Abstract

Chicken meat is one of the most consumed proteins worldwide, however, it is one of the main reservoirs of Escherichia coli which is the main cause of multiple infections after consumption due to different factors such as inefficient handling at the time of slaughter, poor hygiene and inadequate refrigeration. The diseases it causes not only affect the health of consumers, but also the economy of traders. Therefore, this study aimed to identify by sequencing the 16S rRNA gene different strains that were isolated in chicken meat, for this 135 samples were taken and collected from formal and informal points of sale and from 9 slaughtering centers that supply Ambato. The samples were evaluated by means of microbiological and biochemical tests and then DNA was extracted from the 40 suspect samples, which were analyzed by PCR. The results were obtained through sequencing where a total of 33 different strains were identified, strains AF1 and ATCC 11775 were predominant in the chicken meat samples in the canton of Ambato.

Keywords: chicken meat; strains; contamination; *Escherichia coli*; 16S rRNA gene.

Fecha de recibido: 12/04/2023

Fecha de aceptado: 15/07/2023

Fecha de publicado: 25/07/2023

Introducción

La carne de pollo es uno de los alimentos de mayor consumo por el ser humano ya que posee un alto valor biológico debido a que 150g de este tipo de carne proporciona 176 kcal además de 5g de grasa y 32.7 g de proteína, por lo tanto, en Ecuador se han realizado varios estudios acerca de la contaminación microbiana que existe por el manejo inadecuado de la carne para su debida comercialización, esto afecta directamente a la inocuidad de las mismas, siendo un foco infeccioso para el ser humano y como consecuencia en el peor de los casos se puede generar en los consumidores una infección cuando ha sido ingerida (Feye,2020).

Nguyen et al. (2021) afirman que aquellas bacterias las cuales son resistentes a los medicamentos son las mismas que van a contaminar los alimentos, el estudio fue cuantitativo en 15 muestras de carne de pollo y de cerdo, además se pudo determinar que la resistencia de la *Escherichia coli* se debe al gen MCR. Al realizar el análisis filogénico de aislamiento se llegó a la conclusión que la *Escherichia coli* al momento en el que la carne de pollo se comercializa existe una mezcla de clones filogénicos de bacterias que en ese transcurso se multiplican

Un estudio realizado en Huánuco Perú, Vásquez y Tasayco (2020) refieren que la *Escherichia coli* es de gran impacto en dicha ciudad, pues en su estudio plantean que, en un total de 90 muestras tomadas de la carne de pollo, existe un 42% de incidencia de esta bacteria, llegando a la conclusión que en esta localidad no existe un adecuado manejo de la carne de pollo por lo que esta carne no se encuentra apta para la comercialización ni mucho menos para el consumo humano.

Escherichia coli es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae siendo un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no esporulante, además de ser un habitante saprofita del intestino (Jang et al., 2016). Generalmente puede medir de 1-1,5 μm x 2-6 μm . Este patógeno se caracteriza por completar su desarrollo por medio de la temperatura corporal de su hospedador, específicamente en animales endotermos. Existen varias cepas que se distinguen por la virulencia que posee y son las siguientes: enteropatógenas, enteroinvasivas, enterotoxigénicas, enteroagregativas, verotoxigénicas. Sin embargo, tienen en común que todas estas cepas actúan en la mucosa intestinal donde van a producir citotóxicas o enterotoxina (Pakbin et al., 2021).

En los hospedadores la superficie de la mucosa es un medio de adherencia para los microorganismos, teniendo en cuenta que desde el nacimiento estas mucosas específicamente del tracto intestinal, respiratorio y genital son colonizadas por microorganismos que son no patógenos y son llamados microbiota normal, estos llegan al organismo por el aire inspirado o por la alimentación (Psonis y Thanassi, 2019). Sin embargo, a pesar de que las mucosas dispongan de barreras naturales las cuales dificultan que patógenos externos se adhieran, al ser invadidas por los mismos, estos patógenos logran colonizar la mucosa causando daño, en este caso se desarrolla la enfermedad por que la *E. coli* por medio de las adhesinas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F41, F165 se incorporan a los gangliósidos receptores específicos de las microvellosidades del epitelio intestinal, donde solo las cepas que tengan estas adhesinas características, son las que van a lograr adherirse a la mucosa intestinal (Mar Cornelio et al., 2020), (Fonseca & Cornelio, 2022). Para que se dé la patogénesis se tiene que dar una interacción entre el hospedador, el microorganismo y los factores de virulencia tienen que ver aquellas adhesinas y toxinas las cuales destruyen el tejido e inclusive esto puede llegar a la septicemia (Köhler & Dobrindt, 2011)

Las principales vías de transmisión de *E. coli* son por vía digestiva, a través de la bebida o los alimentos, puede encontrarse en carne de aves las cuales no se encuentren bien cocidas (165°F) o estén crudas, además las aves pueden contaminarse en el proceso del sacrificio. *Escherichia coli* es la responsable de la enfermedad diarreica infecciosa donde la enfermedad diarreica aguda es la más común, causando inclusive mortalidad en niños menores a 5 años de edad. También causa enfermedades tales como: gastroenteritis, infección de las vías urinarias, prostatitis, apendicitis, neumonía y diverticulitis (Riley, 2020).

Para poder identificar *Escherichia coli* se debe utilizar medios de cultivo selectivos como es el agar MacConkey además de pruebas bioquímicas, las primeras que se va a mencionar se centran en la determinación de la presencia de enzimas y estas son: prueba de indol, prueba de catalasa y prueba de oxidasa; también tenemos pruebas que se centran en vías metabólicas tales como: TSI, LIA, Citrato, MIO.

Por lo tanto es un tema de interés para salvaguardar la inocuidad de los alimentos que los humanos consumen, ya que la carne de pollo comercializada en el cantón Ambato proviene de varias faenadoras y en la mayoría de los casos no existe un buen manejo de la carne con respecto a su higiene y salubridad en los puntos de comercialización, donde los principales factores de la proliferación de estas bacterias pueden deberse a la contaminación en la manipulación, falta de higiene de los utensilios con el que se manipula la carne así como un incorrecto grado de refrigeración.

El objetivo de este estudio fue identificar molecularmente *Escherichia coli* en muestras de carne de pollo en centros de faenamiento y puntos de expendio en el Cantón Ambato, debido a la alta prevalencia que existe en el lugar por la incorrecta manipulación de las aves al momento del sacrificio a causa de diferentes factores como el uso de utensilios sin una correcta higiene y una inadecuada temperatura de refrigeración, todo esto a largo plazo puede provocar en los consumidores infecciones y enfermedades transmitidas por alimentos. Para ello se llevó a cabo la identificación de estas bacterias Gram negativas por medio de cultivos bacterianos en agar MacConkey, posteriormente se identificaron molecularmente por medio de la secuenciación del gen ARNr 16S para poder caracterizar a los microorganismos y de esta manera adquirir concretamente información taxonómica, así como filogénica de estas bacterias.

Materiales y métodos

Lugar del estudio

Las muestras fueron tomadas en puntos de expendio de la ciudad de Ambato y centros de faenamiento que abastecen el cantón Ambato para posteriormente ser procesadas en el laboratorio de microbiología veterinaria y biología molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato ubicada en el Cantón Cevallos, provincia de Tungurahua.

Toma de muestras

Se recolectaron 135 muestras de carne de pollo, de las cuales 45 se obtuvieron en puntos de expendio informales, 45 muestras fueron tomadas en puntos de expendio con licencia de funcionamiento y los 45 restantes fueron tomados de nueve plantas faenadoras las cuales tienen la debida autorización de Agrocalidad y suministran al cantón Ambato, posteriormente las muestras fueron colocadas en bolsas ziploc y conservadas en un cooler hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

-Preenriquecimiento

De cada una de las muestras se extrajo 25g, posteriormente se colocó en 225ml de agua peptonada y se procedió a incubarlas por 24 horas a una temperatura de 37°C.

-Siembra en medios de cultivo selectivos

Se sembró 100 µl del medio de pre-enriquecimiento en agar MacConkey y se incubaron las placas por un periodo de 24 horas a 37°. El agar MacConkey es un medio utilizado en la identificación presuntiva de bacterias Gram negativas e inhibe el crecimiento de bacilos Gram positivos, ya que se encuentra compuesto por cristal violeta y de sales biliares que inhiben su crecimiento, en este caso las bacterias ácido lácticas acidifican el medio, por ende, existe un viraje en el indicador de pH, de esta manera las bacterias que fermentan lactosa (Lac +) poseen un pH ácido menor de 6,8.

-Tinción Gram

Esta tinción nos permitió diferenciar las bacterias Gram positivas y Gram negativas en el medio de cultivo, pues se basa en las características que posee la pared celular, en este caso la *E.coli* está constituida por una membrana celular externa compuesta por lípidos, lipoproteínas y lipopolisacáridos además de una capa fina de peptidoglicanos los cuales no retienen el complejo cristal violeta-yodo, por lo tanto, en este caso con ayuda de la safranina en las bacterias Gram negativas como es el caso de la *Escherichia coli* se va a poder evidenciar una coloración rosa.

-Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas que se realizaron fueron TSI (Triple Sugar Iron Agar) y Oxidasa. El TSI se lo utilizó para la distinción de los bacilos Gram negativos entéricos, su principio se sustentó en la fermentación de sacarosa, lactosa y dextrosa por medio de rojo fenol, del mismo modo se evaluó la producción del ácido sulfhídrico por medio del sulfato ferroso, por su parte en la fermentación de los azúcares se produce una acidificación, la cual va a manifestarse por una transición en el color de rojo fenol (rojo anaranjado) a un color amarillo con producción de gas, así pues, con ayuda del asa bacteriológica recta se tomó una colonia aislada para dar paso a la inoculación en un tubo TSI; más adelante se llevó a cabo su incubación a 37°C y se procedió a su lectura en las próximas 18-24 horas.

La prueba oxidasa nos permitió establecer la existencia de enzimas oxidasas, ya que la oxidasa reacciona por medio de un sistema denominado citocromo oxidasa, el cual revela la presencia de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos como es el caso de la *E.coli*, así como en microaerófilos, esto se da porque el citocromo al ser una enzima que integra la cadena de transporte de electrones se encarga de entregar estos electrones al oxígeno, ocasionando la creación de agua o formación de peróxido de hidrógeno conforme a la especie de bacteria que se trate, para ello, se utilizó el método de tiras reactivas por su rapidez y sensibilidad.

Extracción de ADN genómico de bacterias

A partir de colonias seleccionadas como sospechosas en el agar MacConkey, se realizó la extracción del ADN en estas bacterias Gram negativas, para ello se recolectó 50 mg de las mismas mediante el asa circular de siembra, para tener un conocimiento claro con respecto a la calidad así como la cantidad de la muestra, la

misma fue evaluada por medio de espectrofotometría de microvolúmenes en donde se tomó en cuenta la referencia de la relación de absorbencia la cual es de 260/280 nm y de esta manera se pudo saber la pureza del ADN con la ayuda de cebadores universales como 27F [5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'] y 1492R [5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'], estas muestras fueron puestas junto con 3 piedras de vidrio esterilizados en microtubos de 1,5 ml, posteriormente se agregó un total de 500 µl de buffer de extracción además de 2 µl de β-mercaptoetanol, seguidamente los microtubos fueron puestos en BeadBeater hasta observar que las muestras se encontraron pulverizadas, se retiraron y se incubó en un periodo de 30 minutos a 60°C en Baño María, posteriormente agregamos un total de 500 µl de cloroformo congelado y con el empleo de un Vortex se consiguió homogenizar en un lapso de 30s, seguidamente estos reposaron por 2 minutos y se los transportó a la centrifugadora por 10 min a 14 500 xg, de esta manera pudimos visualizar un notable sobrenadante que con ayuda de una micropipeta, del mismo se cogió 400 µl que fue trasladado a un nuevo microtubo estéril y se procedió a agregar la misma cantidad de etanol absoluto frío, también se agregó 150 µl de acetato de sodio, 3M y 300 µl de etanol al 70% ya que de esta manera precipitamos el ADN, y dejamos en reposo por 12 horas a -20 °C; centrifugamos a 14500xg en un periodo de 17 minutos, aquí el sobrenadante fue eliminado y lavado con 200 µl de etanol al 70 %, seguidamente se utilizó un pellet de ADN con la finalidad de agregar 25 µl de DEPC junto con 1 µl de RNasa y se incubó a una temperatura de 37 °C por un tiempo de 30 minutos, para finalizar se llevó a almacenar las muestras a una temperatura -20°C.

-PCR convencional

Se realizó por medio del termociclador, en donde las condiciones de los ciclos se efectuaron mediante la desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C, más adelante se realizaron en 3 segundos un total de 30-40 ciclos con desnaturalización a 95°C, un alineamiento Tm -3°C a 5°C en un tiempo exacto de 30 segundos y se hizo una extensión a una temperatura de 72 °C en un tiempo exacto de 1 minuto /kb dirigido al gen 16rRNA, después de realizar lo anterior mencionado de 30 -40 ciclos se realiza una extensión final a una temperatura de 72 °C en un tiempo exacto de 5 minutos para finalizar con un almacenamiento en una temperatura de 10 °C por un tiempo indefinido.

-Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Aquí fueron estudiados aquellos productos de PCR para su debida purificación e identificación en sus fragmentos de ADN, para ello se estableció el volumen adecuado de acuerdo a la capacidad de las cubetas en gel, en este estudio se utilizó un volumen de buffer TBE 1 X junto con la agarosa, seguidamente se combinó la masa de agarosa con el volumen TBE para ser calentado en el microondas en un tiempo inicial de 40 segundos, se repitió este procedimiento hasta llegar a 20 segundos en donde se visualizó homogenizada dicha mezcla, posteriormente se dejó enfriar para agregar 0.5 µg/µl de bromuro de etidio, por último fue puesto en la cubeta de gel el cual se encontró conteniendo peines, y se dejó secar en el medio ambiente.

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa, se añadió el buffer TNE 1X, seguido a esto se procedió a incorporar de 3-5 µl con 1-2 µl de colorante de carga, homogenizamos y posteriormente se cargó el volumen absoluto en pocillos del gel de agarosa, se realizó en una corrida a 90-100 voltios en un periodo de tiempo de 28 a 32 minutos, cabe recalcar que el tiempo, así como también el voltaje dependió directamente del espacio útil de gel, así como del nivel de resolución que se desea en cuanto al tamaño fragmentario del ácido nucleico.

-Secuenciación

Los amplicones fueron enviados a Macrogen Kores, donde se realizó la secuenciación, específicamente con el método Sanger en las dos hebras del fragmento del ADN.

Resultados y discusión

Tras haber realizado la siembra en agar MacConkey, se pudo evidenciar la presencia de *Escherichia coli* en 18 muestras de las 45 de procedencia de puntos de expendio autorizados mientras que en puntos de expendio informales hubo la presencia de esta bacteria en 38 muestras de las 45, esto se pudo demostrar mediante la presencia de las colonias que tomaron una tonalidad rosa, además se constató al microscopio la presencia de bacilos Gram negativos, agregado a lo anterior en la prueba TSI+ existió una coloración amarilla con producción de gas, siendo así de las muestras analizadas existieron 56 de 90 presuntivas a *E. coli* (Tabla 1).

Tabla 1. Posible detección de *E. coli* en muestras de carne de pollo de puntos de expendio formales e informales del cantón Ambato a través de técnicas microbiológicas y pruebas bioquímicas.

Tratamiento	Gram (-)	Morfología (bacilos)	Oxidasa (-)	Agar Mck (Colonias rosa)	Agar TSI(+ amarillo producción de gas)	Posible <i>E.coli</i>
Locales de venta autorizados	100% (45/45)	100% (45/45)	100% (45/45)	40% (18/45)	40% (18/45)	8.1% (18/45)
Informales	100% (45/45)	100% (45/45)	100% (45/45)	84% (38/45)	84% (38/45)	84.4% (38/45)
Total muestras	90	90				

En las muestras procedentes de las nueve plantas de faenamiento se pudo identificar a *E. coli* en agar MacConkey por la presencia de fermentación de lactosa, donde se evidenciaron colonias con una tonalidad rosa, ahora bien, se demostró que de las 45 muestras extraídas de las 9 plantas de faenamiento en 42 de las mismas se evidenciaron colonias presuntivas de *E. coli*, se llegó a esta conclusión debido a que estas colonias en el test de oxidasa dieron negativo, del mismo modo se observó por medio del objetivo 100x bacilos Gram negativos no esporulados, posteriormente en agar TSI en las colonias existió una fermentación tanto de lactosa como de glucosa además de mostrar gas sin ácido sulfhídrico, lo que nos da una evidencia más que se trata de esta bacteria (Tabla 2).

Tabla 2. Posible detección de *E. coli* en muestras de carne de pollo tomadas de 9 centros de faenamiento del Cantón Ambato a través de técnicas microbiológicas y pruebas bioquímicas.

Oxidasa	Tinción Gram		TSI	Colonias Rojizas	Posible <i>E.coli</i>
	bacilo	Gram (-)			
(-)	100%	93.3%	A/A Gas+	(+)	(+)
45	45	42	42	45	42

La detección de *E. coli* en los puntos de expendio (con licencia e informales) descritos en el presente estudio concuerda con la detección reportada previamente por Liaqat et al.(2020), en su estudio expone que mediante tinción Gram, tiras API así como Universal Stress Protein se logró detectar 412 *E. coli* de las 500 muestras recolectadas en tres distritos de KhyberPukhtunkhwa, esto corresponde a un 82,4%, siendo un valor significativo de contaminación microbiana en la carne que posteriormente va a ser consumida por la población.

Por otra parte, Koesoemo et al. (2021) Refiere en su estudio realizado en Surabaya específicamente en Java Oriental, Indonesia que en los mercados de dicha ciudad se recolectaron 60 muestras de carne de pollo, un 40 % de *E. coli* fue identificada a través del agar MacConkey y por el método NMP (número más probable), cabe recalcar que se consideraron positivas solo si existía un valor mayor de 1×10^1 CFU/g.

En otro estudio de Zarei et al. (2021) fue identificada *E. coli* en un 93% de las muestras analizadas, por ende se puede evidenciar claramente que esta bacteria Gram negativa se encuentra presente en la carne de pollo y es consistente con nuestros hallazgos, como podemos deducir, en los cuatro estudios existe una alta prevalencia de esta bacteria, siendo cuestionable la razón de la presencia de la misma, cuyas causas provienen directamente de la cadena de suministro, es decir desde la avícola hasta los puntos de expendio, sus principales factores se deben a la incorrecta técnica de manipulación, higiene y refrigeración que la carne de pollo posee por parte de los comerciantes, tal como menciona Lucas et al. (2016) en su estudio se indagó específicamente la fuente de contaminación por medio de hisopados pertenecientes a las superficies de manos así como de utensilios tales como tablas de picar y mesas utilizadas en los mercados de Lima-Perú para la comercialización, de estas muestras un 40% dio positivo a *E. coli* en las superficies contaminadas por esta bacteria encontrándose un total de 63 cepas diferentes.

Por lo tanto, se ha demostrado explícitamente que una deficiente manipulación conlleva un gran impacto en la contaminación de la carne, corriendo un riesgo significativo en la salud pública de los consumidores causando enfermedades a través de la alimentación que puede ir desde una diarrea hasta en el peor de los casos llegar a una sepsis. Al no saber el manejo que cada uno de los puntos de expendio del cantón Ambato realiza, se considera que la carne no es apta para el consumo humano hasta que se lleve a cabo un exhaustivo control por parte de Agrocalidad, y de esta manera poder brindar a la ciudadanía una carne de buena calidad, libre de contaminación.

Identificación molecular

Una vez extraído el ADN de las colonias aisladas a través de métodos convencionales, su pureza se consideró por medio de la relación de la absorbancia que fue de 260nm, siendo óptima para su posterior amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA a través de los cebadores universales, siendo una técnica eficaz para el reconocimiento taxonómico de las diferentes cepas bacterianas (Valenzuela et al.,2015).

De las 135 muestras se identificaron 40 *E. coli* con 33 cepas diferentes, es de gran relevancia este método debido a que *E.coli* posee diversas de cepas las cuales día con día son detectadas en los diferentes laboratorios , incluso sin esta técnica pueden existir datos erróneos tal como indica el estudio realizado por Sirvertsen et al. (2022) donde *E. Marmotae* se identifica erradamente por *E.coli*, pero con ayuda de la secuenciación se determinó que esta cepa posee rasgos de virulencia genotípica la cual se encuentra estrechamente relacionada con la *E. coli* y su patogenicidad , por lo tanto, la secuenciación nos permitió diferenciar eficazmente cada una de las cepas aisladas de la carne de pollo aunque algunas de estas hayan sido fenotípicamente similares (Salas et al.,2022).

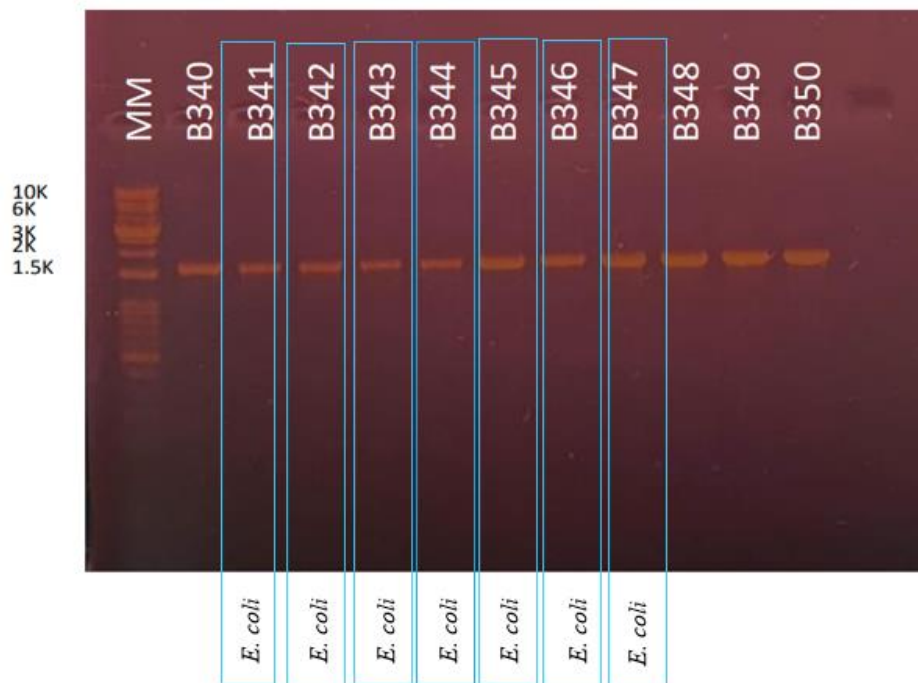
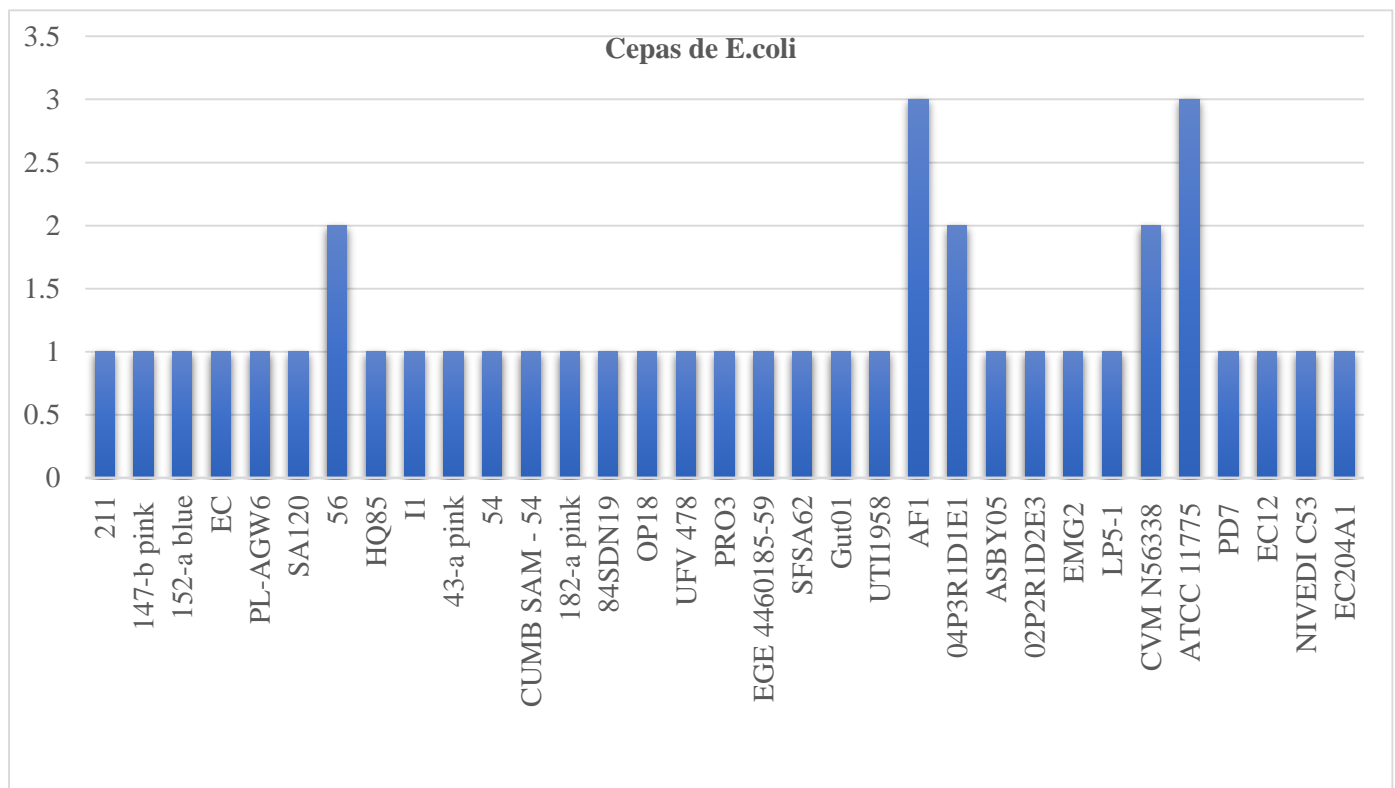


Figura 1. Bandas de electroforesis donde se visualiza fragmentos de 1.5Kb del gen 16Sr en *E.coli*

Identificación molecular de la bacteria Escherichia coli en muestras de carne de pollo que se expenden en el cantón Ambato

Como se mencionó anteriormente el 30,83% de las muestras fueron identificadas molecularmente como *E. coli* por medio de la secuenciación, 33 cepas diferentes fueron identificadas, de las mismas, hubo un mayor número las cepas: AF1 y ATCC 11775 con tres cada una (Figura 3). Es de gran relevancia realizar la identificación molecular ya que en nuestro estudio se identificó un valor significativo de cepas, cada una de ellas presenta características patológicas diferentes, por ende no van a reaccionar de la misma manera a los mismos antibióticos, en el caso de la cepa ATCC 11775 tiene resistencia a las penicilina G y oxacilinas y afecta directamente al tracto urinario en los hospedadores, mientras que la cepa AF1 está ligada al serotipo O157:H7, afecta al tracto gastrointestinal, provocando diarreas sanguinolentas y colitis hemorrágicas en el hospedador, tal como indica Reyes et al.(2013) el serotipo O157:H7 tiene una resistencia significativa a



cefalotina, amikacina, carbencilina y gentamicina, por lo tanto es preocupante que a pesar que todas estas cepas sean *E. coli* difieren en cuanto a su resistencia y por ende de su tratamiento.

Figura 3. Cepas de *E. coli* presentes en las muestras de carne de pollo identificadas por medio de secuenciación

Los resultados indican que 40 de las 135 muestras recolectadas y procesadas por medio de la electroforesis, así como de la secuenciación dieron positivo a *E. coli* (Tabla 3).

Tabla 3. Total de *E. coli* en puntos de expendio y centros de faenamiento.

Establecimiento	No. Muestras <i>E. coli</i>
Puntos de expendio registrados	10
Puntos de expendio no registrados	11
Centros de Faenamiento	19

Los productos cárnicos son los principales reservorios de *E. coli*, esta bacteria se encuentra frecuentemente en los alimentos, se debe principalmente a que integra la microbiota intestinal de los animales; en nuestro estudio se obtuvo un 22% de la presencia de *E. coli* en puntos de expendio registrados, 24% en puntos de expendio no registrados y un 42 % en centros de faenamiento, como podemos deducir los centros de faenamiento presentan el mayor número de prevalencia en la carne de pollo.

Nuestro estudio tiene relación con los resultados obtenidos por Barel et al. (2022) en donde se recolectaron 150 muestras pertenecientes a 5 mataderos diferentes de Kayseri en Turquía, del total de muestras un 36% dio positivo a *E. coli*. Sebsibe y Asfaw (2020) igualmente obtienen que, en los mataderos, así como en las carnicerías de las 505 muestras, 102 es decir un 20,2% de ellas fueron positivas a *E. coli*, sin embargo, en mataderos de Tailandia en un estudio realizado por Klaharn et al. (2022) en 1.707 muestras se determinó solo un (OR = 2,69, IC del 95 %: 1,58-4,56) de contaminación bacteriana por *E. coli*. Por otra parte en nuestro estudio se determinó que en el proceso en el que las aves fueron sacrificadas, en las fases de eviscerado así como de escalado las canales de pollo fueron más propensas a contaminarse por *E.coli*, esto concuerda con Pacholewicz et al. (2016) en su investigación revelan las razones de la contaminación bacteriana en dos mataderos ,se consideró 19 en total , entre ellas la manipulación de la carne , lotes, variables ambientales y rendimiento todo esto relacionado con escaldado, seguidamente del desplumado, eviscerado y finalmente enfriado, cada matadero fue evaluado , en el primero se evidenció poca uniformidad referente al peso de la canal en un lote específico, con una inferior concentración de *E.coli* posterior al desplumado; en el segundo matadero se evidenció *E.coli* en excretas, esto llevo a la deducción de que las bacterias se encontraban en excretas y ciegos ,perjudicando directamente el proceso de faenamiento de las canales. Trokhymchuk et al. (2014) refiere en su estudio que el entorno regulatorio influye directamente en la contaminación de la carne, pues en instalaciones las cuales tienen licencia provincial se identificó una carga bacteriana inferior a aquellas instalaciones que poseían una licencia local. Por lo tanto en nuestro estudio, para que exista una disminución en estos porcentajes de la alta prevalencia de esta bacteria en los 9 centros de faenamiento debe existir un correcto manejo de las aves en el faenamiento y en la manipulación de la carne así como del ambiente regulatorio en donde se realiza el sacrificio, además las personas a cargo juegan un papel primordial en la calidad microbiológica de la carne, pues son las responsables del proceso de faenamiento de las aves , por ende se debería realizar charlas en donde se les indique las normas a cumplir e inclusive que solamente personas certificadas puedan realizar esta labor, para de esta manera conseguir una mayor inocuidad en los

alimentos debido a que de las principales vías de entrada de *E. coli* es por medio de la cadena alimentaria y de esta manera exista una disminución de ETAs y de mortalidad a causa de *E. coli*

Conclusiones

La carne de pollo que provienen de las plantas de faenamiento que suministran al cantón Ambato fueron las que mayor porcentaje de contaminación por *E. coli* obtuvieron, sus causas principalmente se deben a las deficientes medidas sanitarias en el proceso de faenamiento específicamente en las fases de eviscerado, escaldado también a la manipulación de la carne y al entorno regulatorio en el que se las aves son sacrificadas. La identificación fenotípica y bioquímica no es concluyente por ende la identificación molecular es vital para poder definir a que cepa de *E. coli* nos enfrentamos, siendo predominantes las cepas AF1 y ATCC 11775 respectivamente.

Agradecimientos

Se agradece profundamente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, por el apoyo otorgado, especialmente a la Dra.Sandra Cruz por su orientación y dedicación a lo largo de esta investigación.

Referencias

- Barel , M., Hizlisoy, H., Gungor , C., & et al. (2022). *Escherichia coli* serogroups in slaughterhouses: Antibiotic susceptibility and molecular typing of isolates. *Int J Food Microbiol* 16;371:109673.
- Bastidas León, A. (2018). Determinación de *Escherichia coli* O157: H7 por el método Oficial AOAC 996.09 en carne de res faenada. Tesis de Química de Alimentos. Quito: Univ. Central del Ecuador. 107p.
- Feye, K., Thompson , D., Rothrock , M., Kogut , M., & Ricke , S. (2020). Poultry processing and the application of microbiome mapping. *Poult Sci* 99(2):678-688.
- Fonseca, B. B., & Cornelio, O. M. (2022). Sistemas de recomendación para la Gestión de Proyectos. Análisis Bibliométrico. *Serie Científica de la Universidad de las Ciencias Informáticas*, 15(5), 70-84.
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M., Byappanahalli, M., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications. *Applied Microbiology* 123(3):570-581.
- Jang-Seu Ki , Wen Zhang, & Pei-Yuan Qian. (2009). Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. *Journal of Microbiological Methods* 77 (1): 48-57.
- Koesoemo , D., Prihastuti, A., Elziyad , M., Ayu, D., & Annisa, S. (2021). Detection of microbial contamination in chicken meat from local markets in Surabaya, East Java, Indonesia. *Veterinary World* 14 (12): 3138-3143.

- Köhler, C., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology* 301(8):642-647.
- Liaqat, Z., Khan, I., Azam, S., Anwar, Y., Althubaiti, E., & Maroof, I. (2022). Isolation and molecular characterization of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* from chicken meat in Pakistan. *PLOS ONE* 17 (6): e0269194.
- Lucas, J., Morales, S., Salazar, E., Eslava, C., & Alvarado, D. (2016). Contaminación por *Escherichia coli* Shigatoxigénica en Puestos de Expendio de Carne de Pollo en un Distrito de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27(3), 618–625.
- Mar Cornelio, O., Bron Fonseca, B., & Gulín González, J. (2020). Sistema de Laboratorios Remoto para el estudio de la Microbiología y Parasitología Médica. *Revista Cubana de Informática Médica*, 12(2).
- Nguyen, T., Khong, D., Le, H., Tran, H., Phan, Q., Le, H., Yamamoto, Y. (2021). Quantitative Analysis of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Retail Meat from Local Vietnamese Markets. *Biomed Res Int* 2021: 6678901.
- Pacholewicz, E., Swart, A., Wagenaar, J., Lipman, L., & Havelaar, A. (2016). Associated with *Campylobacter* and *Escherichia coli* Concentrations on Broiler Chicken Carcasses during Processing in Two Slaughterhouses. *J Food Prot* 79(12):2038-2047.
- Pakbin, B., Bruck, W., & Rossen, J. (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci* 22(18):9922.
- Pérez Pintado, A. C., & Astudillo Vallejo, K. F. (2020). Caracterización molecular de aislados de *Escherichia coli* en pollos de carne (*Gallus gallus domesticus*) de la provincia de Azuay, Ecuador. *Tesis Médico Veterinario Zootecnista*. 41p.
- Psonis, J., & Thanassi, D. (2019). Therapeutic Approaches Targeting the Assembly and Function of Chaperone-Usher Pili. *EcoSal Plus*. *EcoSalPlus* 8(2):10.1128/ecosalplus.ESP-0033-2018
- Ramírez Aguilera, J., Medina Romero, Y., & Uscanga García, I. (2018). MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. Disponible en: <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Microbiologia.pdf>
- Reyes, N., Talavera, M., Varela, J., Barba, J., Gutiérrez, A., & Alonso, U. (2013). Prevalencia y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* O157:H7 aislada de canales de bovinos sacrificados en rastros del altiplano central Mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 4(2):235-242.
- Riley, L. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 33385193
- Salas, M., Benito, S., Pérez, A., del Amo Arregui, C., Ormazabal, M., & Hidalgo, M. (2022). Secuenciación de bacterias ARNR 16S. *Revista Sanitaria de Investigación*. Disponible en: <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/secuenciacion-de-bacterias-arnr-16s/>.

- Sebsibe, M. A., & Asfaw, E. T. (2020). Occurrence of Multi-Drug Resistant Escherichia Coli and Escherichia Coli O157:H7 in Meat and Swab Samples of Various Contact Surfaces at Abattoir and Butcher Shops in Jimma Town, Southwest District of Ethiopia. *Infect Drug Resist* 13:3853-3862.
- Sivertsen, A., Dyrhovden, R., Gjerde, M., Sæle Bruvold, T., Nybakken, E., Skutlaberg, D., Kommedal, Ø. (2022). Escherichia marmotae-a Human Pathogen Easily Misidentified as Escherichia coli. *Microbiol Spectr* 10(2):e0203521.
- Trokhymchuk, A., Waldner, C., Gow, S., Chaban, B., & Colina, J. (2014). Comparison of baseline bacterial levels in retail ground beef originating from different regulatory, processing, and packaging environments. *J Food Prot*, 77(3):404-411.
- Valenzuela, F., Casillas, R., Villalpando, E., & Vargas, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas* 41 (4), 297-313.
- Vásquez Ampuero, J., & Tasayco Alcántara, W. R. (2020). Presencia de patógenos en carne cruda de pollo en centros de expendio, Huánuco-Perú: una problemática en salud. *Revista de la Sociedad de Investigación Selva Andina* vol. 11, núm. 2, 2020, pp. 130-141.
- Zarei, O., Shokoohizadeh, L., Hossainpour, H., & Alikhani, M. (2021). The Prevalence of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Enteropathogenic Escherichia coli Isolated from Raw Chicken Meat Samples. *International Journal of Microbiology* 2021: 3333240.