



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA



Centro Universitario, 07 de enero de 2020.

CONSEJO ACADÉMICO
FACULTAD DE QUÍMICA
P R E S E N T E.

Nos permitimos informar que una vez revisado la Tesis individual denominada: "**MÉTODO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE *Escherichia coli* PATOGENICA EXTRAINTESTINAL EN MATRICES ALIMENTARIAS**", presentada por la pasante **ALEXIA JOANA LÓPEZ GACHUZO** con opción a recibir el Título de **Ingeniero Químico en Alimentos**, de acuerdo al Artículo 95, fracción IX, del Reglamento de Titulación vigente.
Emitimos nuestro voto aprobatorio.

ATENTAMENTE
"EDUCO EN LA VERDAD Y EN EL HONOR"


DR. GERARDO MANUEL NAVA MORALES


M. EN C. CAROLINA NATHALIE RESÉNDIZ NAVA


DR. EDMUNDO MERCADO SILVA


DRA. ANDREA MARGARITA OLVERA RAMÍREZ

c.c.p. - archivo
Mhv



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“MÉTODO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE
Escherichia coli PATOGENICA EXTRAINTESTINAL EN
MATICES ALIMENTARIAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ING. QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ALEXIA JOANA LÓPEZ GACHUZO

DIRIGIDA POR

DR. GERARDO MANUEL NAVA MORALES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“MÉTODO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE
Escherichia coli PATOGENICA EXTRAINTESTINAL EN
MATICES ALIMENTARIAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ING. QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ALEXIA JOANA LÓPEZ GACHUZO

DIRIGIDA POR

DR. GERARDO MANUEL NAVA MORALES

SINODALES

DR. GERARDO MANUEL NAVA MORALES

DIRECTOR

M. en C. CAROLINA NATHALIE RESÉNDIZ NAVA

SINODAL

DR. EDMUNDO MERCADO SILVA

SINODAL

DRA. ANDREA MARGARITA OLVERA RAMÍREZ

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 <i>Escherichia coli</i> patogénica extraintestinal (ExPEc)	1
1.2 Patogenicidad de ExPEc	2
1.3 Prevalencia de ExPEc y pérdidas económicas asociadas	3
1.4 Prevalencia de ExPEc en carne lista para consumo y riesgo zoonótico	3
1.5 Detección convencional de ExPEc en productos alimenticios	4
1.6 Detección molecular de ExPEc en productos cárnicos	5
1.7 Ensayos moleculares mediante PCR para la detección de los genes de virulencia	6
2. HIPÓTESIS	7
3. OBJETIVOS	8
3.1 General	8
3.2 Específicos	8
4. METODOLOGÍA	9
4.1 Materiales	9
4.1.2 Medios de cultivo	9

4.1.3 Soluciones	9
4.2 Métodos	10
4.2.1 Análisis bioinformáticos	10
4.2.2 Estandarización del protocolo de PCR para la detección molecular de ExPEc a partir de matrices alimentarias	10
4.2.3 Selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes <i>iutA</i> , <i>hlyF</i> , <i>iss</i> , <i>iroN</i> y <i>ompT</i>	11
4.2.4 Aislamiento y detección de ExPEc	12
4.2.5 Extracción del material genético	12
4.2.6 Prevalencia en puntos de venta	13
5. RESULTADOS	14
5.1 Análisis bioinformáticos	14
5.2 Estandarización del protocolo de PCR para la detección molecular de ExPEc a partir de matrices alimentarias	14
5.3 Selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes <i>iutA</i> , <i>hlyF</i> , <i>iss</i> , <i>iroN</i> y <i>ompT</i>	16
5.4 Aislamiento y detección de ExPEc	18
5.5 Prueba piloto: Prevalencia en puntos de venta	19
6. DISCUSIÓN	20
6.1 Aspectos técnicos de la PCR	20
6.2 ExPEc en alimentos y carne	21
7. CONCLUSIONES	23
8. REFERENCIAS	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Prevalencia de ExPEc en productos avícolas y pollos	4
2	Características generales de las determinantes genéticas de la <i>E. coli</i> patogénica	5
3	Iniciadores de PCR seleccionados para la detección de <i>E. coli</i> patogénica	10
4	Resultados de la eficiencia de los iniciadores utilizados para la detección de ExPEc	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama general para el aislamiento de <i>E. Coli</i>	12
2	Gradiente de temperatura (55 Δ 68 °C) para la selección de la temperatura de alineación de las cinco determinantes genéticas	15
3	Detección de los genes <i>iroN</i> (carril 1-9), <i>ompT</i> (carril 10-18), <i>iutA</i> (carril 19-27), y <i>hlyF</i> (carril 28-34) a partir de un pool de una mezcla 5:1 de ADN de microbiota de Jamaica y ADN extraído de los aislamientos de ExPEc	16
4	Gradiente de temperatura (55 Δ 68 °C) para la selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes <i>iss</i> e <i>iutA</i>	17
5	Imagen representativa de la amplificación de las determinantes genéticas de los 37 aislamientos obtenidos de carne de pollo	18
6	Prevalencia de los genes de virulencia (<i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>hlyF</i> , <i>ompT</i> e <i>iss</i>) en aislamientos provenientes de carne de pollo	19
7	Prevalencia de ExPEc en puntos de venta	19

RESUMEN

Las *Escherichia coli* patógenas extraintestinales (ExPEc) causan infecciones en el tracto urinario y en sitios extra-intestinales. La virulencia de estos patógenos está determinada por factores que promueven la adherencia a tejidos, evasión de la defensa del huésped, adquisición de hierro e invasión celular. Las ExPEc pueden ser transmitidas a través de alimentos contaminados; desafortunadamente, no existe un método para su detección. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un ensayo molecular para la detección de ExPEc a partir de matrices alimentarias. Se identificaron cinco genes (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT*) de virulencia considerados como predictores mínimos de ExPEc y se estandarizó un ensayo de PCR para la detección de cada uno de ellos. Los protocolos de PCR, se realizaron tres etapas: 1) se llevaron a cabo análisis bioinformáticos para evaluar la especificidad de los iniciadores de PCR, 2) se efectuó un ensayo de amplificación a partir de medios de cultivo inoculados con aislamientos o ADN de ExPEc y 3) se realizó una prueba piloto para la detección de ExPEc a partir de carne de pollo cruda expedida en la Cd. de Querétaro, Qro. Los ensayos de PCR permitieron la detección de los cinco genes, *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT*; a partir de medios de cultivo. Además, estos análisis revelaron la presencia de ExPEc en el 45% de las muestras cárnicas evaluadas; sugiriendo una alta prevalencia de este patógeno. Este ensayo de PCR puede ser una herramienta esencial para la rápida y oportuna detección de ExPEc en matrices alimentarias y una herramienta para la identificación de fuentes de contaminación.

1. ANTECEDENTES.

1.1 *Escherichia coli* patogénica extraintestinal (ExPEc).

Las bacterias de la especie *Escherichia coli* se clasifican en tres grandes grupos: comensales, patogénicas intestinales (entéricas o diarreicas) y patogénicas extraintestinales (Filho y col., 2015). Las cepas comensales de *E. coli* forman parte de la microbiota intestinal de animales y humanos; colonizan el tracto intestinal en las primeras 24 horas subsecuentes al nacimiento (Stromberg y col., 2017) y el establecimiento de estas poblaciones favorece el microbioma intestinal, integrado por más de 1,000 especies (Conway y Cohen, 2015).

Las *E. coli* patogénicas intestinales son causantes de diarrea. Estas bacterias han evolucionado mediante la adquisición de genes a través de transferencia horizontal; de acuerdo a la cantidad y tipo de determinantes genéticos de virulencia adquiridas. Las combinaciones de factores de virulencia dan lugar a distintos patotipos con diferentes fenotipos de colonización, virulencia, y daños que causan al hospedador (Gomes y col., 2016). Los diferentes patotipos de *E. coli* se clasifican en enteropatógenas (EPEC), enterohemorrágicas (productoras de la toxina shiga, EHEC/STEC), enteroagregativas (EAEC), enterotoxigénicas (ETEC) y enteroinvasivas (EIEC) (Gomes y col., 2016).

Por otra parte, la *Escherichia coli* patogénica extraintestinal (ExPEc, por sus siglas en inglés) es el agente de enfermedades del tracto urinario (ITU), sistema nervioso central y circulatorio, meningitis neonatal y sepsis en humanos (Mellata, 2013); y el agente etiológico de la colibacilosis en pollos y pavos (Filho y col., 2015). La habilidad de las ExPEc para colonizar diferentes órganos se debe a la plasticidad de su genoma, a la pérdida de material genético y a la adquisición de factores de virulencia (Dale y Woodford, 2015). Estudios genómicos han revelado que los genes de virulencia: *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, y *ompT* son las determinantes mínimas para catalogar a una ExPEc (Johnson y col., 2008). Por lo tanto, la transferencia horizontal de genes es un factor importante en la evolución y adaptación de *E. coli*

en diferentes nichos (Johnson y col., 2008) sin embargo cabe destacar que estas cepas son filogenética y epidemiológicamente distintas de las cepas comensales e intestinales ya que no producen enfermedades entéricas, por lo que pueden tener más factores de virulencia como son los genes *papA*, *sfa*, *afa*, *kps*, entre otros (Smith y col., 2007).

1.2 Patogenicidad de ExPEc.

A nivel global, las ExPEc son responsables de un gran número de infecciones en humanos, lo que causa grandes costos por atención médica y pérdidas por ausentismo laboral (Manges y col., 2019); se ha reportado que las ExPEc ocasionan más del 85% de las ITU (Mellata, 2013).

Las ExPEc poseen genes de virulencia que les permiten invadir, colonizar y ocasionar enfermedades fuera del tracto gastrointestinal tanto en los humanos como en las aves (Nandanwar y col., 2014), pues se adhieren a órganos como la vejiga y el riñón (Nandanwar y col., 2014). Estas enfermedades van desde ITU, sepsis y bacteriemia, hasta meningitis en recién nacidos (Mellata, 2013). Los principales factores de virulencia asociados con las ExPEc son los genes: *hlyF*, *iroN*, *iutA*, *iss* y *ompT* (Koga y col., 2014) (Cuadro 1). Estos genes se localizan en plásmidos o en el cromosoma (Mellata y col., 2010) y su expresión codifica para toxinas, sideróforos, cápsulas y proteínas de invasión, lo que determina su grado de virulencia (Mellata y col., 2010). Dichos genes se encuentran en regiones específicas llamadas islas de patogenicidad (PAI, por sus siglas en inglés) (Dale y Woodford, 2015). El gen de virulencia *hlyF* codifica para la proteína denominada HlyF, la cual posee actividad hemolítica e induce la producción de vesículas que favorece la liberación de otras toxinas bacterianas (Murase y col., 2016). Las *E. coli* que contienen el gen *hlyF* han sido asociadas a casos de meningitis neonatal (Murase y col., 2016). Por otra parte, el gen *iroN* codifica una enterobactina (Feldman y col., 2007); esta proteína es un sideróforo que se encarga de quelar el hierro durante la infección y es producida por algunas cepas de ExPEc (Caza y col., 2011). El gen *iutA* codifica una proteína que tiene una función de receptor de

aerobactina férrica (Cunha y col, 2017) y su presencia en cepas de ExPEc está asociada a casos de bacteriemia (Kurkdijian y col., 2014). El gen *ompT* codifica una proteasa que actúa en la membrana citoplasmática y degrada la protamina lo que provoca la permeabilización de dicha membrana (Nicholson y col., 2016). El gen *iss* codifica para una lipoproteína que está involucrada en la resistencia al complemento del suero (Johnson y col., 2008).

1.3 Prevalencia de ExPEc y pérdidas económicas asociadas.

Estas cepas son causantes de ITU y cada año tan solo en Estados Unidos se diagnostican ~8 millones de enfermedades producidas por ese patógeno, lo que ocasiona una pérdida económica de ~2 billones de dólares anuales (Bergeron y col., 2012). En países en vías desarrollo, se calcula que la mortalidad ocasionada por ExPEC varía entre el 40 y 58% (Thaver y Zaidi., 2009; Furyk y col, 2011); además, este patógeno ha sido involucrado en ~30% de los casos de meningitis neonatal durante la etapa inicial de la infección (Verani y col., 2010, Heat y col, 2011; Stoll y col, 2011). Estudios recientes sugieren que las ExPEc pueden ser transmitidas al ser humano por el consumo de carne de pollo (Manges y Johnson, 2012; Mitchell y col; 2015). Sin embargo, no se ha evidenciado la presencia de ExPEc en este tipo de alimento.

1.4 Prevalencia de ExPEc en carne lista para consumo y riesgo zoonótico.

Las ExPEc pueden transmitirse al ser humano a través del consumo o contacto con animales infectados; lo que representa un potencial riesgo zoonótico (Ewers y col., 2009). Además de las determinantes genéticas de ExPEc, se ha evidenciado la presencia de otros genes de virulencia (*kpsM II*, *papA*, *sfaS*, *facG*, *iutA*, *papC*, y *hlyD*) y perfiles de resistencia antimicrobiana zoonótico (Ewers y col., 2009). Estos análisis han revelado una asociación entre los aislamientos obtenidos de los pacientes con ITU y los aislamientos obtenidos de la carne (Ewers y col., 2009). Estos resultados también indican que dichos productos pueden ser la fuente de contaminación para la transmisión de ExPEc a los humanos (Jakobsen y col.,

2010). En conjunto, todos estos estudios demuestran que las ExPEc presentes en productos cárnicos pueden ser una fuente de contaminación y transmisión en el ser humano; sin embargo, hasta el momento no están definidos los mecanismos de transmisión, colonización e infección (Stromberg y col., 2017).

Cuadro 1. Prevalencia de ExPEc en productos avícolas y pollos.

Muestra	Prevalencia (%)	Referencia
Productos avícolas	71	Bergeron y col., 2012
Pollos	38.2	Bergeron y col., 2012

1.5 Detección convencional de ExPEc en productos alimenticios.

Los métodos convencionales para la identificación de *E. coli* se basan en la habilidad de las bacterias entéricas para fermentar la lactosa; esta característica puede ser identificada mediante la producción de gas en un tubo de ensaye con caldo lauril sulfato triptosa (LST) adicionado con 4-metilumbeliferilo- β -D-glucorónido con una campana Durham en su interior (Ruíz y col., 2004). Estos tubos se incuban a 35°C durante 24 h y posteriormente, se observa la producción de gas. Esta metodología es utilizada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) de EE. UU como el método tradicional para la detección de *E. coli*. Posteriormente se hacen las pruebas bioquímicas confirmatorias (Fernández, 2000; Kornacki y Johnson, 2001; Feng y col, 2002; McLandsborough, 2005; Kornacki y Johnson, 2001), las cuales se llevan a cabo en un periodo de ~48 horas e incluyen: oxidasa, catalasa, indol y citrato (Kornacki y Johnson, 2001). Mientras que para la tipificación serológica de *E. coli* se identifican los antígenos somático, flagelar y capsular (Vidal y col., 2007). El método de detección basado en el cultivo bacteriano es considerado el método estándar; sin embargo, el gran uso de reactivos y materiales costosos ha llevado a la búsqueda de nuevas metodologías para la detección de patógenos. Además, las técnicas convencionales de aislamiento de *E. coli*, requieren más de 48 horas de trabajo y no permite distinguir entre cepas de *E. coli* comensales y patógenas (Leininger y

col., 2001). Por esta razón, diversos estudios han planteado el uso de metodologías rápidas para la oportuna identificación de este patógeno en muestras ambientales y clínicas (Farahmandfar y col., 2016). Estos métodos alternos se basan en ensayos de PCR cultivo-independientes, los cuales son rápidos y altamente sensibles (Farahmandfar y col., 2016) y se basan en la detección de genes de virulencia específicos de cada patógeno (Johnson y col., 2008).

1.6 Detección molecular de ExPEc en productos cárnicos.

Los avances en la microbiología molecular permiten desarrollar métodos específicos para la rápida detección de ExPEc basados en la amplificación de determinantes genéticos específicas (Ikuta y col., 2014). Se han identificado 5 genes asociados a la virulencia de las cepas de APEc y ExPEc (Cuadro 2). La amplificación de dichos genes se lleva a cabo mediante la técnica de PCR utilizando los iniciadores que se encuentran descritos en la literatura (Cuadro 3).

Cuadro 2. Características generales de las determinantes genéticas de la *E. coli* patogénica.

Gen	Proteína que codifica	Función	Referencia
<i>iroN</i>	Enterobactina	Sideróforo del Fe ³⁺	Bauer, 2002; Hantke, 2003; Feldmann, 2007.
<i>ompT</i>	Proteasa	Degrada la protamina y su sitio de acción es la membrana citoplasmática, donde provoca la permeabilización en la membrana.	Stompe, 1998.
<i>iutA</i>	iutA	Receptor de la membrana externa de la aerobactina férrica.	Lorenzo, 1986; Funanashi, 2003.
<i>hlyF</i>	hlyF	Mejora el fitness competitivo en la sangre.	Murase, 2016.
<i>iss</i>	Lipoproteína	Resistencia al complemento del suero.	Barondess, 1995.

1.7 Ensayos moleculares mediante PCR para la detección de los genes de virulencia.

Los aislamientos que se obtienen de *E. coli* son sometidos a una amplificación de PCR para determinar la presencia de los cinco genes asociados a la virulencia de ExPEc (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT*) puesto que estos genes son los mínimos predictores y confieren la virulencia a este patógeno. Se identifican de acuerdo a sus distintos pares de bases (300, 450, 323, 553 y 496 bp respectivamente). Las reacciones se llevan a cabo en un termociclador con condiciones específicas de cada reacción y todas las muestras se someten a una electroforesis en un gel de agarosa. Hasta el momento estos protocolos solo se han utilizado para la identificación de ExPEc que afecta a los animales en producción (Johnson y col., 2008).

2. HIPÓTESIS.

La amplificación de las determinantes genéticas *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT* a través de ensayos de PCR permitirá la rápida y efectiva identificación de ExPEc en matrices de alimentos.

3. OBJETIVOS.

3.1 General.

Diseñar, estandarizar e implementar un método de PCR que permita la rápida detección de ExPEc en matrices alimentarias.

3.2 Específicos.

- Evaluar a través de análisis bioinformáticos la especificidad de los iniciadores de PCR desarrollados para la amplificación de las determinantes genéticas *iutA*, *hlyF*, *iroN*, *iss* y *ompT*.
- Desarrollar y validar un ensayo molecular para la detección de las determinantes genéticas de ExPEc.
- Evaluar a través del ensayo molecular la prevalencia de ExPEc en carne de pollo.

4. METODOLOGÍA.

4.1 Materiales.

4.1.1 Equipo.

- Fotodocumentador.
- Mini-sistema de electroforesis horizontal (Bio-rad).
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
- Termociclador (Bio-rad, C-1000).
- Incubadora (Mettler).
- Centrífuga (Metrix Dynamica, Velocity 14).
- Transiluminador (LabNet).

4.1.2 Medios de cultivo.

- Agar soya tripticasa (AST), (BD, Bioxon).
- Caldo soya tripticasa (CST), (BD, Bioxon).
- Agar MacConkey (MAC), (BD, Bioxon).
- Agar EMB (Acumedia).
-

4.1.3 Soluciones.

- Agarosa al 1.5% (Bioline)
- Diluyente de peptona 0.1% (DP) (Peptona de caseína).
- Solución salina isotónica (SSI).
- Buffer TBE.

4.1.4 Reactivos.

- Kit de extracción Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research).
- Bromuro de etidio (Bio-Rad).
- Enzimas utilizadas para realizar la PCR: Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase y Taq Phire Hot Start II DNA Polymerase.

4.2 Métodos.

4.2.1 Análisis Bioinformáticos.

A través de una búsqueda en la literatura científica se seleccionaron los pares de iniciadores reportados frecuentemente para la detección de ExPEc (Cuadro 2). Posteriormente se realizó un análisis bioinformático usando la herramienta BLAST del NCBI (Altschul y col., 1990) con la finalidad de evaluar la especificidad de los iniciadores seleccionados. Como resultado, se obtuvieron los cinco pares de iniciadores específicos para la detección de ExPEc.

4.2.2 Estandarización del protocolo de PCR para la detección molecular de ExPEc a partir de matrices alimentarias.

Para la estandarización de los protocolos de PCR, se utilizó como control positivo un G. Block (Integrated DNA Technologies), que es un gen artificial que contiene todas las secuencias de nucleótidos de los 5 genes predictivos de ExPEc (Cuadro 3) y se llevaron a cabo gradientes de temperatura de alineación en un rango de 55 a 68 °C para cada par de iniciadores con la finalidad de obtener fragmentos específicos y del tamaño esperado.

Cuadro 3. Iniciadores de la PCR seleccionados para la detección de *E. coli* patogénica.

Nombre del primer	Secuencia	Gen que amplifica	Amplicón (tamaño)	Referencia
iroN-F	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT	<i>iroN</i>	553 bp	Johnson y col., 2008
iroN-R	GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT			
ompT-F	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT	<i>ompT</i>	496 bp	
ompT-R	TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC			
hlyF-F	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC	<i>hlyF</i>	450 bp	Morales y col., 2004
hlyF-R	GGCGTTTAGGCATTCCGATACTCAG			

iutA-F	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	<i>iutA</i>	300 bp	Johnson y col., 2008
iutA-R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
iss-F	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	<i>iss</i>	323 bp	
iss-R	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA			

Para validar el uso de ensayos moleculares para la detección de ExPEc, se empleó una matriz alimentaria con sustancias inhibitorias y microbiota diversa. Para este fin, se utilizaron muestras de cálices de Jamaica. 25 g de este producto se mezclaron con agua peptonada amortiguada (APA), y se incubaron a 35°C durante 24 horas. Posteriormente, se tomó 1 ml del caldo de cultivo para llevar a cabo la extracción de ADN genómico con el kit comercial Quick-gADN™ MiniPrep (Zymo Research). Con la finalidad de validar el ensayo molecular para detección de ExPEc, el ADN de la microbiota de Jamaica se inoculó con material genómico extraído de dos aislamientos de ExPEc, propiedad del laboratorio de microbiología molecular. El ADN extraído de los aislamientos de ExPEc se incluyó como control positivo, mientras que el material genético extraído de aislamientos de *Listeria* se utilizó como control negativo utilizando las siguientes condiciones: cada reacción consistió: 5 ng/μl de DNA, 3.4 μl Buffer 5X, 0.85 μl BSA, 0.34 μl 10 mM dNTP, 0.68 μl de cada iniciador (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iron* y *ompT*) y 0.34 μl Taq polimerasa. Para ambos iniciadores la PCR se realizó con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, alineación de 63 °C por 30 s, una extensión de 72°C por 30 s y extensión final a 72 °C por 2 min. La PCR para cada gen se realizó de forma independiente y cada pozo fue cargado con 5 μl de cada producto de PCR y estos se visualizaron mediante una electroforesis con un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio durante 30 min.

4.2.3 Selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iron* y *ompT*.

Para obtener una mejor amplificación se probaron con un gradiente de temperatura de 55, 56.2, 58, 60.1, 63.1, 65.5, 67.1 y 68 °C en el mismo protocolo de PCR las

siguientes enzimas comerciales: Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase y Thermo Scientific Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase con el fin de seleccionar la mejor taq DNA polimerasa. Para evaluar la eficiencia de la amplificación se utilizó como control positivo el G. Block, utilizando el mismo protocolo de PCR.

4.2.4 Aislamiento y detección de ExPEc.

Las muestras se procesaron de la siguiente forma: se pesaron 25 g de piel de pollo de ambas piezas con 225 ml de BPW (1:10) y se homogenizaron con un masajeo manual por 1 min. Las muestras se incubaron a 35°C durante 24 h. Posteriormente se sembró la dilución 1:10 en cajas Petri con agar EMB y agar MacConkey, utilizando el método de extensión en superficie. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h. Posteriormente, se tomaron las colonias con morfología característica de *E. coli* que se presentó como un brillo verde metálico en el agar EMB y como colonias de color rosa en el agar MacConkey. Se realizaron 2 pases adicionales con la finalidad de obtener cultivos puros. Las colonias seleccionadas se crecieron en 6 ml de caldo soya tripticasa (CST) incubado a 37°C por 24 horas (Figura 1). Una alícuota (1000 µl) de este caldo se utilizó para la extracción de ADN genómico y el resto se almacenó en glicerol para resguardo en el cepario del laboratorio de Microbiología Molecular.



Figura 1. Diagrama general para el aislamiento de *E. coli*.

4.2.5 Extracción del material genético.

Las alícuotas de 1000 µl de CST se emplearon para la extracción de ADN con el kit comercial de extracción Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research) siguiendo las recomendaciones del fabricante, utilizando una centrífuga (Metrix Dynamica,

Velocity 14). La concentración y pureza del ADN se evaluó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). El ADN obtenido se utilizó para los ensayos de PCR.

4.2.6 Prevalencia en puntos de venta.

Una vez estandarizado el protocolo de PCR, se procedió a realizar un muestreo en 5 mercados públicos y 5 súper mercados del estado de Querétaro, elegidos estratégicamente de acuerdo a su ubicación. En cada punto de venta, se obtuvieron dos piernas y dos muslos de pollo con piel, cada muestra se identificó debidamente y se transportó al laboratorio en bolsas de plástico estériles y en una hielera a una temperatura de 4°C para su procesamiento.

5. RESULTADOS.

5.1 Análisis Bioinformáticos.

Con la búsqueda en la literatura científica se seleccionaron 5 pares de iniciadores (Cuadro 2) reportados para la detección de los genes de virulencia característicos de ExPEc. Para determinar la efectividad de estos pares de iniciadores para reconocer su secuencia blanco, se realizó un análisis de PCR *in silico* utilizando el programa Primer-Blast del NCBI (Ye y col., 2012). La eficiencia de cada par de iniciadores se estimó usando el número de aciertos (secuencias detectadas) entre el total de secuencias objetivo existentes en la base de datos obteniendo un buen número de aciertos con una alta especificidad para los pares de iniciadores.

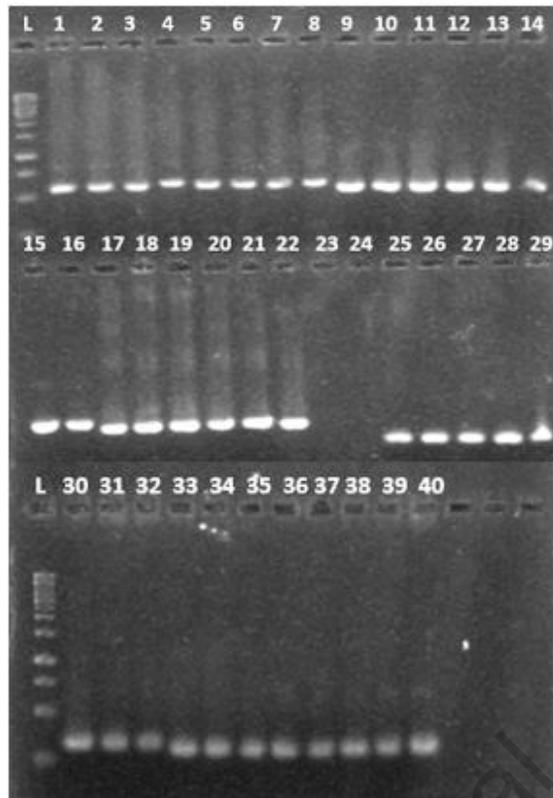
Cuadro 4. Resultados de la eficiencia de los iniciadores utilizados para la detección de ExPEc.

Primer	Secuencia	Bacteria	Homología
iroN-F	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT	<i>E. coli</i>	100%
iroN-R	GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	<i>E. coli</i>	100%
ompT-F	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT	<i>E. coli</i>	100%
ompT-R	TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	<i>E. coli</i>	100%
hlyF-F	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC	<i>E. coli</i>	100%
hlyF-R	GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	<i>E. coli</i>	100%
iutA-F	GGCTGGACATCATGGGAAGCTGG	<i>E. coli</i>	100%
iutA-R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	<i>E. coli</i>	100%
iss-F	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	<i>E. coli</i>	100%
iss-R	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	<i>E. coli</i>	100%

5.2 Estandarización del protocolo de PCR para la detección molecular de ExPEc a partir de matrices alimentarias.

Para definir las mejores temperaturas de alineación de los iniciadores, se realizaron ensayos de PCR con un gradiente de temperatura. Estos ensayos revelaron que la mejor temperatura de alineación fue de 63.1 °C; basado en la calidad de los

productos amplificados, bandas del tamaño específico e intenso, sin la presencia de artefactos (Figura 2) en la amplificación de los 5 genes (Cuadro 3).



Temperatura (°C)	<i>iroN</i>	<i>ompT</i>	<i>hlyF</i>	<i>iss</i>	<i>iutA</i>
	Gen				
68	1	9	17	25	33
67.1	2	10	18	26	34
65.5	3	11	19	27	35
63.1	4	12	20	28	36
60.1	5	13	21	29	37
58	6	14	22	30	38
56.2	7	15	23	31	39
55	8	16	24	32	40

Figura 2. Gradiente de temperatura (55 Δ 68 °C) para la selección de la temperatura de alineación de las cinco determinantes genéticas (L: Ladder). El número de pozo corresponde a un gen y temperatura de alineación determinada (cuadro derecho)

El protocolo seleccionado durante la estandarización a través de los gradientes de temperatura de PCR logró la amplificación de fragmentos de los tamaños 553 bp, 496 bp, 300 bp y 450 bp para los genes *iron*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA*, respectivamente.

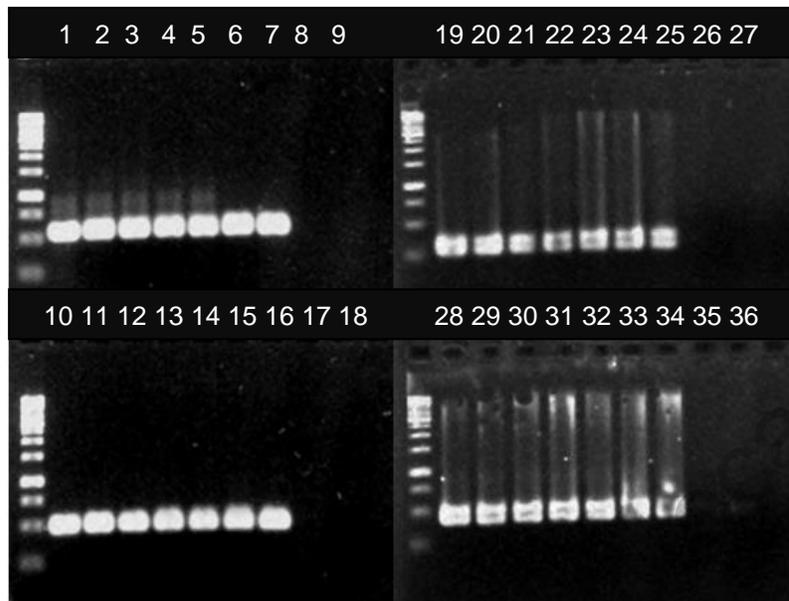


Figura 3. Detección de los genes *iroN* (carril 1-9), *ompT* (carril 10-18), *iutA* (carril 19-27) y *hlyF* (carril 28-34) a partir de un pool de una mezcla 5:1 de ADN de microbiota de Jamaica y ADN extraído de los aislamientos de ExPEc.

5.3 Selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT*.

El ensayo para la evaluación de la efectividad de la Taq-DNA polimerasa, reveló que la Phire Hot Start II fue la enzima más eficiente para detectar los cinco genes; esto basado en la obtención de productos de amplificación del tamaño esperado. Además, se observaron productos de amplificación más intensos y brillantes, en contraste con las bandas resultantes del ensayo realizado con la enzima Maxima Hot Start (Figura 4) en donde las bandas no tienen la misma intensidad y en algunas ocasiones no se logró la amplificación del material genético; principalmente para el gen *iss*. Basado en estos resultados, se seleccionó la enzima Phire Hot Start II para los ensayos de detección de ExPEc a partir de matrices alimentarias.

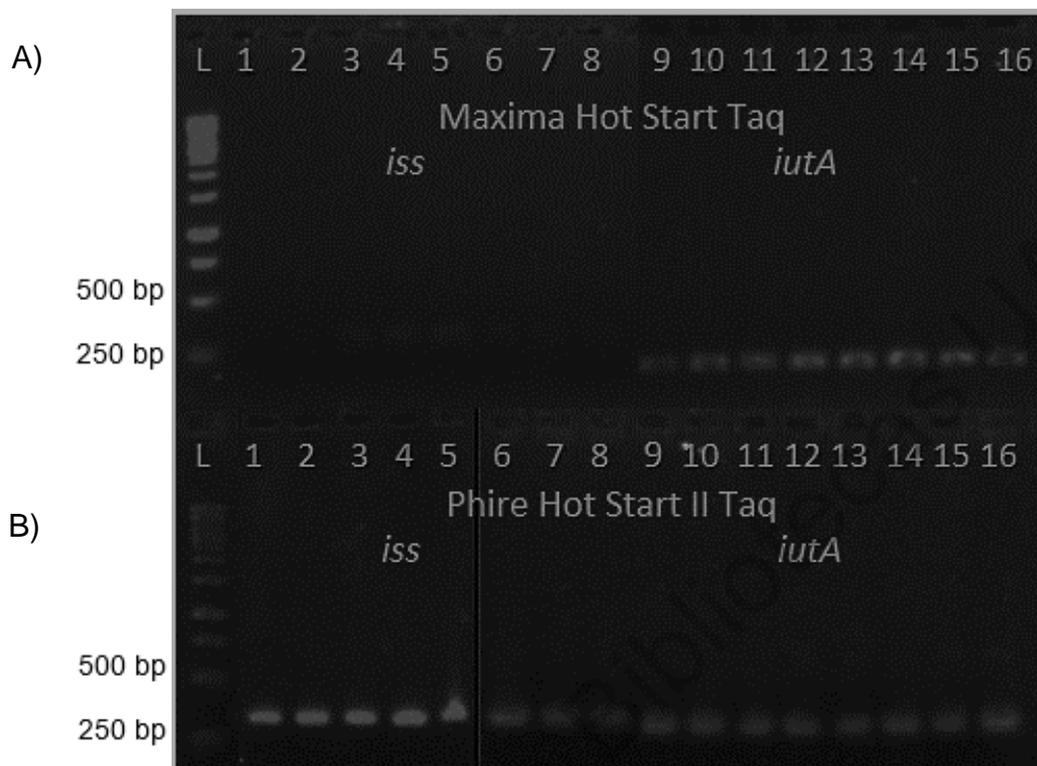


Figura 4. Gradiente de temperatura ($55 \Delta 68$ °C) para la selección de la Taq DNA polimerasa comercial más eficiente para la detección de los genes *iss* e *iutA*. A) Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase y B) Phire Hot Start II Taq. Carril 1 y 9 = 68 °C; carril 2 y 10 = 67.1 °C; carril 3 y 11 = 65.5 °C; carril 4 y 12 = 63.1 °C; carril 5 y 13 = 60.1 °C; carril 6 y 14 = 58 °C; carril 7 y 15 = 56.2 °C; carril 8 y 16 = 55 °C.

Cada carril de la figura 2 representa una T (°C) específica a la que se realizó la alineación de la PCR, del número 1 – 8 se encuentran los productos del gen *iss* mientras que del 9 – 16 representa el gen *iutA*. La reacción de PCR también se hizo con los genes *iroN*, *ompT* y *hlyF* sin embargo las bandas obtenidas no son distintas utilizando las diferentes enzimas ya que se tiene una buena amplificación en todas las temperaturas utilizadas (Cuadro 3), es por ello que se muestran los resultados de los genes *iss* e *iutA* ya que solamente en ellos se observó una diferencia en la amplificación.

5.4 Detección de ExPEc a partir de muestras de carne cruda de pollo.

Se obtuvieron 32 y 5 aislamientos presuntivos de *E. coli* en los medios MacConkey y EMB; respectivamente. Estos aislamientos se sometieron a los ensayos de PCR dirigido a la amplificación de las 5 determinantes genéticas de ExPEc. Los ensayos de PCR, revelaron la presencia de fragmentos específicos, del tamaño esperado y sin la presencia de artefactos (Figura 5) en muestras de carne de pollo. La mayor prevalencia de genes de virulencia se observó para *iroN* (54.1%) e *iutA* (54.1%), seguido del *hlyF* (51.4%), *ompT* (31 %) e *iss* (25%). Basado en la presencia de los 5 genes de virulencia, la prevalencia de aislamientos de ExPEc en fue de 24% (Figura 6).

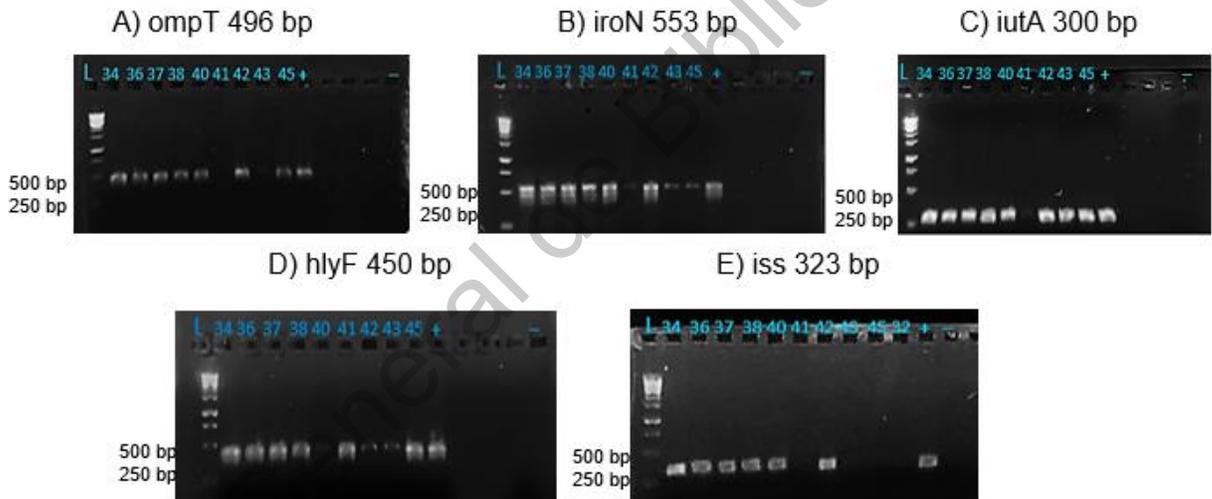


Figura 5. Imagen representativa de la amplificación de las determinantes genéticas de los 37 aislamientos obtenidos de carne de pollo.

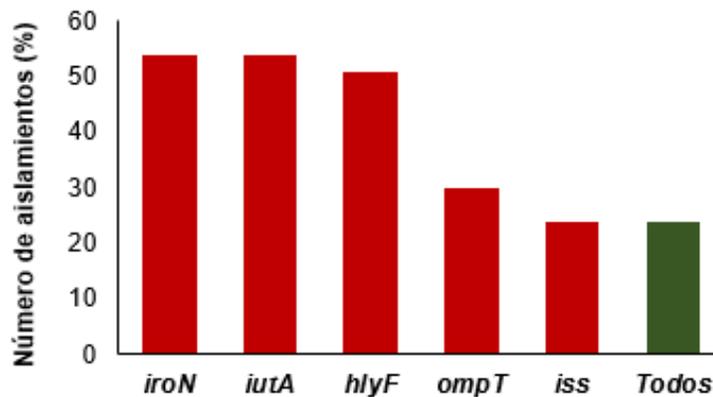


Figura 6. Prevalencia de genes de virulencia (*iroN*, *iutA*, *hlyF*, *ompT* e *iss*) en aislamientos provenientes de carne de pollo.

5.5 Prueba piloto: Prevalencia de ExPEc en puntos de venta.

Con la finalidad de validar los protocolos para la detección de las cinco determinantes genéticas, se colectaron muestras de carne de pollo obtenidas en Mercados Públicos y Supermercados. El estudio reveló la presencia de ExPEc en el 24% de las muestras evaluadas. La prevalencia de este patógeno en supermercado y mercado público fue de 20% y 4% respectivamente (Figura 7).

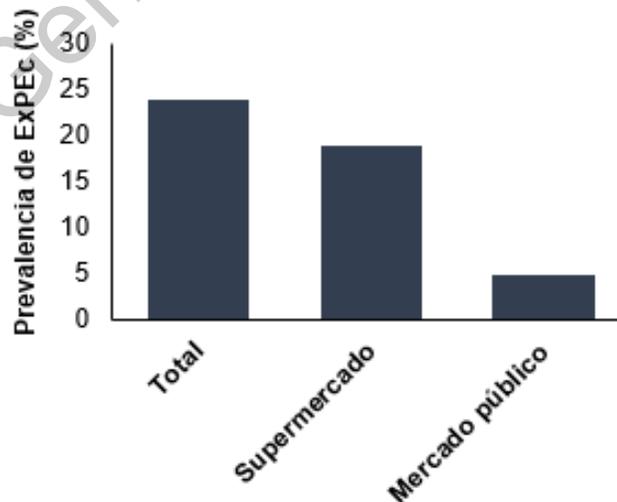


Figura 7. Prevalencia de ExPEc en puntos de venta.

6. DISCUSIÓN

6.1 Aspectos técnicos de la PCR.

A través de este ensayo de PCR, se logró identificar la presencia de ExPEc en muestras de alimentos, basado en la amplificación de los genes los genes *iroN*, *ompT*, *iutA*, *hlyF* e *iss*. La adquisición de estos genes le confiere a ExPEc la habilidad de sobrevivir en diferentes nichos fuera de su hábitat intestinal y le permite inducir infecciones extraintestinales tanto en huéspedes sanos como inmuno-comprometidos (Smith, 2007; Mellata, 2013). La habilidad de la *E. coli* para colonizar diferentes sitios anatómicos está determinada por la plasticidad de su genoma y a la adquisición o pérdida de material genético. Por lo tanto, la transferencia horizontal de genes es un factor importante en la evolución y adaptación de *E. coli* en diferentes nichos (Ahmed y col, 2008; Mellata y col, 2010). La expresión de genes que codifican para toxinas, sideróforos cápsulas e invasiones determinan el potencial de virulencia de las bacterias patógenas (Hilbert y col., 2008). Por lo tanto, la detección de estas determinantes genéticas es fundamentales para la identificación de ExPEc en muestras clínicas o ambientales.

Otro aspecto importante en el desarrollo de un ensayo molecular para la detección de ExPEc, es la validación del ensayo en matrices ricas en sustancias inhibitorias de la PCR, que dificultan la detección de patógenos. En el presente estudio se reveló que la enzima Phire Hot Start II es más efectiva para la detección de ExPEc a partir de muestras de alimentos. Esta enzima es de alta fidelidad capaz de amplificar largos fragmentos de ADN con un alto rendimiento debido a su característica de incorporar una unión única con una cadena doble de DNA, lo que le permite tener tiempos cortos de extensión (10 – 15 s/kb) por lo lo que mejora el rendimiento e incrementa la fidelidad en comparación con otras enzimas (Wikman y col., 2004).

En este estudio, se basa en la determinación de las cinco determinantes genéticas establecidas para la detección de ExPEc (Smith, 2007; Mellata, 2013). El ensayo de PCR dirigido para estos genes, permitió la detección de este patógeno en

matrices alimentarias. Estos genes codifican para distintos factores de virulencia, el gen *hlyF* es específico de las hemolisinas y es codificado por el plásmido CoIV además ha demostrado ser un marcador epidemiológico de *E. coli* patogénica aviar (APEC) (Dissanayake y col, 2014; Ahmed y col, 2013) así como de meningitis neonatal asociada a *E. coli* (NMEC) (Kaczmarek y col., 2012). El gen *iutA* codifica para receptores de aerobactinas y se ha encontrado en aislamientos de ExPEC asociados con bacteriemia. El gen *iroN* codifica para receptores de sideróforos y el *ompT* codifica para las proteínas de la membrana externa que pueden degradar el interferón gamma (Koga y col., 2014) (Nicholson y col., 2016) mientras que el gen *iss* codifica para una lipoproteína que está involucrada en la resistencia al complemento del suero (Barondess y col., 1995). Debido a las graves enfermedades que causa este patógeno, es muy importante tener un método rápido y eficaz de detección (Johnson y col., 2008). El ensayo estandarizado en el presente trabajo permite la detección de ExPEC en un periodo < 24 horas.

6.2. Prevalencia de ExPEC en alimentos y carne.

Algunos estudios han documentado la presencia de ExPEC en diversos puntos de la cadena de producción y distribución de alimentos (Jakobsen y col, 2011; Manges, 2016; Aslam, 2014). Estos estudios han evidenciado la presencia de este patógeno en muestras de pollo congelado (Aslam y col., 2014) y en huevos destinados al consumo humano (Mitchell y col., 2014). En el presente estudio, evidenciamos la presencia de ExPEC en carne de pollo comercializada en mercados públicos y supermercados. En conjunto, estos estudios resaltan la necesidad de realizar estudios de ExPEC para conocer su prevalencia, distribución y diversidad de este patógeno; un patógeno que causa frecuentemente infecciones extraintestinales en humanos (Nordstrom, 2013). Se ha sugerido que la presencia de ExPEC en productos cárnicos se debe a un manejo inadecuado del producto en plantas de procesamiento (Guenther, 2010). Estos resultados sugieren que la carne de pollo es un potencial vehículo para la transmisión de ExPEC a los humanos (Eldsberg y col., 2014; Heat y col, 2011).

Las ExPEc también producen pérdidas económicas en la producción de carne de pollo. Este patógeno causa graves problemas sistémicos en pollo de engorda (Ewers y col., 2009). En general, la patogenicidad de las ExPEC se asocia a la presencia de genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT*, localizados en plásmidos o cromosomas denominadas islas de patogenicidad (Johnson y col, 2006; Johnson y col, 2008). Estos genes son esenciales para la distinción entre una *E. coli* comensal y una patogénica. Además, la presencia de otros genes como *fimH*, *traT*, *fyuA*, *chuA*, *vat*, *pap*, *sfa*, *usp*, etc. permiten la clasificación de otras variantes de ExPEC (Sarowska y col., 2019). En conjunto, el uso de ensayos de PCR para la detección de genes de virulencia ofrece una excelente oportunidad para avanzar el conocimiento de la virulencia de *E. coli* y desarrollar ensayos enfocados a la rápida y oportuna detección de estos patógenos.

7. CONCLUSIONES.

Este trabajo describe el diseño de un ensayo molecular para la detección de ExPEc en un periodo máximo de 24 horas que se basa en la amplificación de los genes *iutA*, *hlyF*, *iroN*, *iss* y *ompT* a partir de caldos de pre-enriquecimiento. Estos resultados demuestran que es una técnica rápida y efectiva para la detección de ExPEc en matrices alimentarias. Por estas razones, este ensayo es una herramienta importante que permitirá identificar las fuentes de contaminación y distribución de este patógeno, así como para la determinación de su prevalencia en alimentos y establecimientos. Estas herramientas serán esenciales para establecer estrategias de prevención y control de este patógeno.

8. REFERENCIAS

- Ahmed** A, Shimamoto T. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Int J Med Microbiol.* **2013**; 303:475–83.
- Altschul** S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **1990**; 215:403-410.
- Aslam** M, Toufeer M, Narvaez C, Lai V, Rempel H, Manges A, Diarra M. Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol.* **2014**; 177:49–56.
- Barondess** J, Beckwith J. Bor gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *Journal of Bacteriology.* **1995**; 177:1247-1253.
- Bauer** R, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen M, Saxen H, Marrs C. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection—usp, iha, and iron (*E. coli*). *J. Infect. Dis.* **2002**; 185:1521-1524.
- Bergeron** C, Prussing C, Boerlin P, Daignault D, Dutil L, Reid J, Manges A. Chicken as reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases.* **2012**; 18:415-421.
- Conway** T, **Cohen** P. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the gut. *Microbiol Spectr.* **2015**; 3:1.24.
- Caza** M, Lépine F, Dozois C. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology.* **2011**; 80:266-282.
- Cunha** M, Becker A, Micke A, Piantino J, Midolli M, Tardelli T, Knobl T. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. *Plos One.* **2017**; 12:1-12.
- Dale** A, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal of Infection.* **2015**; 71:615.626.
- Dang** C, Jayasena S. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR. *J Mol Biol.* **1996**; 264:268-278.

Dissanayake D. Octavia S. Lan R. Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. Microbiology. **2014**; 168:403–12.

Edelsberg J. Weycker D. Barron R. Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. **2014**; 78:255–62.

Ewers C, Antao E, Diehl I, Philipp H, Wieler. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. Applied and Environmental Microbiology. **2009**; 75:184-192.

Ewers C. Li G. Wilking H. Kiebling S. Alt K. Antao E. Homeier T. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? International Journal of Medical Microbiology. **2007**; 297:163-176.

Farahmandfar M. Moori N. Gooraninezhad S. Zarei M. Comparison of two methods for detection of *E. coli* O157:H7 in unpasteurized milk. Iran J Microbiol. **2016**; 5:282-287.

Feldmann F, Sorsa L, Hildinger K, Schubert S. The Salmochelin siderophore receptor ironN contributes to invasion of urothelial cells by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* In Vitro. Infection and Immunity. **2007**; 75:3183-3187.

Fernández, E. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México, **2000**:35-48.

Filho H, Brito T, Cavalli S, Brito B. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) an update on the control. The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs. Brazil: Vilas, **2015**;2:598-608.

Funanashi T. An iron-regulated gene required for utilization of aerobactin as an exogenous siderophore in *Vibrio parahemolyticus*. Microbiology. **2003**;149:1217-1225.

Furyk S, Swann O, Molyneux E. Systematic review: neonatal meningitis in the developing world. Trop Med Int Health. **2011**; 16:672–679.

Gomes T, Waldir P, Scaletsky I, Guth B, Rodrigues J, Piazza R. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian Journal of Microbiology. 2016; 47:3-30.

Guenther S. Grobbel M. Beutlich J. Guerra B. Ulrich R. Wieler L. Ewers C. Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9

extended-spectrum β -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). J Antimicrob Chemother. **2010**; 65:582–4.

Guerini M. Arthur T. Hackleford S. Koochmaraie M. Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 Growth Media for Use in Test-and-Hold Procedures for Ground Beef Processing. Journal of Food Protection. **2006**; 69:1007-1011.

Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. Proc. Natl. Acad. Sci. **2003**; 100:3677-3682.

Heath P, Okike I, Oeser C. Neonatal meningitis: can we do better?. Adv Exp Med Biol. **2011**; 719:11–24.

Hilbert D. Paulish T. Mordechai E. Adelson M. Trama J. O serogroups, phylogeny, and virulence factors of cervicovaginal and rectal *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol Infect Dis. **2008**; 27:1265-1268.

Mitchell N. Johnson J. Johnston B. Curtiss R. Mellata M. (2014). Zoonotic Potential of *Escherichia coli* Isolates from Retail Chicken Meat Products and Eggs. Applied and Environmental Microbiology. **2014**; 81:1177-1187.

Ikuta N, Oliveira S, Lehmann F, Silveira P, Carli S, Casanova Y, Celmer A, Fonseca A, Lunge V. Taqman real-time PCR assays for rapid detection of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Avian Dis. **2014**; 58:628-631.

Jakobsen L, Spangholm D, Pedersen K. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. International Journal of Food Microbiology, **2010**; 142:264-272.

James L. Smith L. Pina M. Nereus W. Gunther. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne Pathogens and disease. **2007**; 4:2-7.

Johnson T, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson S, Rosenberger S, Nolan L. Identification of minimal predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. Journal of clinical microbiology. **2008**; 46:3987-3996.

Kaczmarek A, Budzynska A, Gospodarek E. Prevalence of genes encoding virulence factors among *Escherichia coli* with K1 antigen and non-K1 *E. coli* strains. J Med Microbiol. **2012**; 61:1360–1365.

Kobayashi H, Kubota J, Fujihara K, Honjoh K. Simultaneous Enrichment of *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Listeria monocytogenes* by Single Broth and Screening of the Pathogens by Multiplex Real-time PCR. Food Sci. Technol. Res. **2009**; 15:427-438.

Koga V, Rodrigues G, Scandorieiro S, Vespero E, Oba A, Brito B, Nakazato G, Kobayashi R. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. Foodborne Pathogens Disease. **2014**; 12:88-94.

Kornacki J, Johnson J. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ta. ed. American Public Health Association, USA **2001**:69-77.

Kurkdijian M, Lemaitre C, Bidet P, Pérez D, Boggini L, Kwon T, Bonacorsi S. Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype. New Microbes New Infect. **2014**; 2:127-131.

Leininger D, Roberson J, Elvinger F. Use of eosin methylene blue agar to differentiate *Escherichia coli* from other gram-negative mastitis pathogens. J Vet Diagn Invest 13;283-275.

Lorenzo V, Bindereif A, Paw B, Neilands J. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. Journal of bacteriology, **1986**;165:570-578.

Manges A, Johnson J. Foodborne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. Clin Infect Dis. **2012**; 55:712–719.

Mbanga J, Nyararai Y. Virulence gene profiles of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in Bulawayo, Zimbabwe Onderstepoort. Journal of Veterinary Research. **2015**; 8:841-850.

Mellata M, Ameiss K, Mo H, Curtiss R. Characterization of the contribution to virulence of three large plasmids of avian pathogenic *Escherichia coli* chi7122 (O78:K80:H9). Infect Immun. **2010**; 78:1528-1541.

Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis.* **2013**; 10:916–932.

Mitchell N, Johnson J, Johnston B, Curtiss R, Mellata M. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Appl Environ Microbiol.* **2015.** 81:1177–1187.

Morales C, Lee M, Hofacre C, Maurer J. Detection of a novel virulence gene and a *Salmonella* virulence homologue among *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Foodborne Pathog Dis.* **2004**; 1:169-165.

Murase K, Martin P, Porcheron G, Houle S, Helloin E, Pénary M, Nougayrède J, Dozois C, Hayashi T, Oswald E. *HlyF* Produced by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that Regulates outer membrane vesicle biogenesis. *The Journal of Infectious Diseases.* **2016**; 213:856-865.

Nandanwar N, Janssen T, Kuhl M, Ahmed N, Ewers C, Wieler L. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) of human and avian origin belonging to sequence type complex 95 (STC95) portray indistinguishable virulence features. *International Journal of Medical Microbiology.* **2014**; 304:835-842.

Nicholson B, West A, Mangiamele P, Barbieri N, Wannemuehler Y, Nolan L, Logue C, Li G. Genetic characterization of ExPEC-Like virulence plasmids among a subset of NMEC. *Plos One.* **2016**; 11:477-486.

Poolman J. Wacker M. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *J Infect Dis.* **2016**; 213:6-13.

Reiner G, Berg V, Hillen S, Clemens N, Huisinger M, Burkhardt, Weiis R, Reinacher M. Haemorrhagic septicaemia in a pig caused by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) as a differential diagnosis in classical swine fever case report and review of the literature. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **2010**; 123:119-124.

Ruíz T. Cruz A. Duarte E. Juárez V. Alonso M. Contreras R. Empleo del sistema DIRAMIC en la determinación de la calidad microbiológica del agua. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* **2004**; 35:37-40.

Sarowska J, Bozena F, Agnieszka J, Freaj M. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*. **2019**; 11:10-16.

Stoll B, Hansen N, Sánchez P. Early onset neonatal sepsis: the burden of group *B Streptococcal* and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*. **2011**; 127:817–826.

Stompe S, Schmid R, Stephens D, Georgiou G, Bakker P. Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **1998**; 180:4002-4006.

Stromberg R, Johnson R, Fairbrother M, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss R. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *Plos one* **2017**; 12:3-7.

Thaver D, Zaidi A. Burden of neonatal infections in developing countries: a review of evidence from community based studies. *Pediatr Infect Dis J*. **2009**; 28:53–59.

Verani J, McGee L, Schrag S. Prevention of perinatal group B streptococcal disease revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep*. **2010**; 59:1–36.

Vidal J, Canizález R. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública Méx*. **2007**;49: 376-385.

Walid A, Gaydashow R, Petrova E, Panin A, Tugarinov O. Prevalence of *Salmonella* on Retail Chicken Meat in Russian Federation. **2012**; 8: 1469-1473.

Wang X, Jothikumar N, Griffiths M. Enrichment and DNA extraction protocols for simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J. Food Prot*. **2004**; 67:189-192.

Wikman M, Steffen A, Gunneriusson E, Tolmachev V, Adams G, Carlsson J, Ståhl S. Selection and characterization of HER2/neu-binding affibody ligands. *Protein engineering and design selection*. **2004**; 17:455–462

Witte A, Sickha R, Mester P, Rossmanith P. Essential role of polymerases for assay performance—Impact of polymerasereplacement in a well-established assay. *Biomolecular Detection and Quantification*. **2018**; 16:12-20.

Ye J, G Coulouris, I Zaretskaya, I Cutcutache, S Rozen, T L Madden. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. **2012**; 13:133-134.