



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Caracterización patogénica de aislados de *Escherichia coli* rojo congo positivos obtenidos de aves ligeras”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MIGUEL MOISES CEJUDO MENDOZA

ASESORES:

M. en C. POMPOSO FERNÁNDEZ ROSAS
Dr. En C. HUMBERTO GUSTAVO MONROY SALAZAR

REVISORES:

DR. VALENTE VELAZQUEZ ORDOÑEZ
DR. MARTIN TALAVERA ROJAS

TOLUCA, MÉXICO, MARZO DE 2017.



DEDICATORIAS

Dedico este proyecto de tesis a mi familia, a mi padre el MVZ. Saturnino Miguel Cejudo Rojas, a mi madre la Sra. Inocencia Mendoza Morales, a mis hermanos Josué Cejudo Mendoza, Aarón Cejudo Mendoza y María Inés Cejudo Mendoza; porque gracias a ellos, a su apoyo incondicional y a su cariño, me han dado la fuerza para poder concluir este trabajo.

Dedico también este trabajo a mis abuelos, al Sr. Miguel Cejudo Salas+, al Sr. Ambrosio Mendoza Hernández+, a la Sra. Inés Rojas Piña y a la Sra. Inocencia Morales Orozco+. Y a toda mi demás familia; Ya que sin duda lo más valioso que tiene una persona en la vida es la familia y mi familia en todo momento ha estado conmigo brindándome su apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos institucionales:

Agradezco a la UAEMEX por haberme cobijado en sus aulas como alumno universitario.

Agradezco a la FMVZ de la UAEMEX por mi formación como Médico Veterinario Zootecnista.

Agradezco al CIESA- FMVZ-UAEMEX por permitirme realizar este trabajo de tesis y por todos los conocimientos y experiencias adquiridas en este centro.

Agradezco a la Empresa Agropecuaria Sanfandila por haberme permitido realizar el muestreo para la obtención de los aislados de *E. coli*.

Agradecimientos personales:

Agradezco a todos los catedráticos de la FMVZ-UAEMEX por haberme transmitido sus conocimientos y experiencias durante mi carrera de licenciatura.

Agradezco a mi asesor el Dr. Pomposo Fernández Rosas por todo su apoyo para realizar este proyecto de investigación, por transmitirme sus conocimientos y experiencias profesionales, por guiarme durante la carrera y durante la realización de este trabajo.

Agradezco a mi asesor el Dr. Humberto Gustavo Monroy Salazar por todo su apoyo, asesoría y conocimientos para el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mis revisores el Dr. Martin Talavera Rojas y el Dr. Valente Velázquez Ordóñez por apoyo y sus conocimientos transmitidos para la correcta realización de este trabajo.

TÍTULO

“Caracterización patogénica de aislados de *Escherichia coli* rojo congo positivos obtenidos de aves ligeras”.

INDICE

DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TÍTULO	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPÓTESIS.....	15
V. OBJETIVOS.....	16
VI. MATERIAL	17
VII. MÉTODO.....	19
VIII. LÍMITE DE TIEMPO	23
IX. LÍMITE DE ESPACIO.....	24
X. RESULTADOS	25
XI. DISCUSIÓN:.....	39
XII. CONCLUSIONES.....	41
XIII. SUGERENCIAS.....	42
XIV. LITERATURA REVISADA	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de los grupos, aislado inoculado y fenotipo al que pertenece cada aislado	25
Tabla 2. Resultados observados a la necropsia de los grupos de desafío, control positivo y control negativo	26
Tabla 3. Tabla de ANOVA para aerosaculitis	32
Tabla 4. Tabla de ANOVA para peritonitis	33
Tabla 5. Tabla de ANOVA para congestión pulmonar	34
Tabla 6. Tabla de ANOVA para edema pulmonar	35
Tabla 7. Tabla de ANOVA para neumonía fibrinopurulenta	36
Tabla 8. Tabla de ANOVA para aislamiento bacteriológico de pulmón	37
Tabla 9. Tabla de ANOVA para aislamiento bacteriológico de hígado	38

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Aerosaculitis observada en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo	27
Gráfica 2. Peritonitis observada en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo	28
Gráfica 3. Congestión pulmonar observada en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo	29
Gráfica 4. Edema pulmonar observado en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo	30
Gráfica 5. Neumonía fibrinopurulenta observada en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo	31
Gráfica 6. Comparación de medias de los grupos de desafío con análisis para aerosaculitis	32
Gráfica 7. Comparación de medias de grupos de desafío con análisis para peritonitis	33
Gráfica 8. Comparación de medias de grupos de desafío con un análisis para congestión pulmonar	34
Gráfica 9. Comparación de medias de grupos de desafío con análisis para edema pulmonar	35
Gráfica 10. Comparación de medias de grupos de desafío con análisis para neumonía fibrinopurulenta	36
Gráfica 11. Comparación de medias de grupos de desafío con análisis para aislamiento bacteriológico a partir de pulmón	37
Gráfica 12. Comparación de medias de grupos de desafío con análisis para aislamiento bacteriológico a partir de hígado	38

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la capacidad patogénica de 5 aislados de *Escherichia coli* rojo congo positivos y 5 rojo congo negativos obtenidos de aves ligeras aparentemente sanas de 1-5 días de edad, con la finalidad de establecer la probable relación entre el fenotipo rojo congo positivo y el carácter patogénico de dichos aislados, para ello se desafiaron aves ligeras inoculándolas con los aislados mencionados. Se formaron 12 grupos de aves, con 15 individuos cada grupo, manteniéndolos separados con alimento comercial sin antibióticos y agua a libre acceso. Los grupos se identificaron con letras mayúsculas de la A a la L. Los 5 aislados de *E. coli* rojo congo positivos se inocularon en los grupos de la A a la E, mientras los 5 aislados de *E. coli* rojo congo negativos fueron inoculados en los grupos de la F a la J. El grupo K se inoculó con la cepa de referencia ATCC 8739 APEC y se utilizó como grupo control positivo. El grupo L inoculado con caldo de soya tripticasa estéril se utilizó como grupo control negativo (Tabla 1). Los 10 aislados de *E. coli* a probar y la cepa de referencia ATCC 8739 fueron propagados en caldo de soya tripticasa para la obtención de los inóculos de desafío. El título aproximado de los inóculos fue de 1×10^7 UFC/ml. A las 10 semanas de edad las aves fueron desafiadas con los 10 aislados y la cepa ATCC 8739 por vía endotraqueal. La dosis de desafío fue de 0.2 ml de inóculo/ave. El grupo control negativo fue inoculado similarmente con caldo de soya tripticasa estéril, a razón de 0.2 ml de caldo/ave. Las aves desafiadas fueron observadas diariamente durante 3 días post-inoculación para registrar signos, mortalidad o cambios en el comportamiento. Ningún ave presentó signos ni murió durante estos 3 días, cumpliéndose el tiempo de observación las aves fueron sacrificadas humanitariamente, practicándose la necropsia para observar lesiones. Todos los aislados y la cepa de referencia produjeron lesiones compatibles con colisepticemia. Las lesiones observadas fueron aerosaculitis, peritonitis, neumonía fibrinopurulenta, edema y congestión pulmonar (Tabla 2). Para el re-aislamiento bacteriológico se tomaron muestras de hígado y pulmón de todas las aves inoculadas. Se obtuvieron aislados de *E. coli* en cultivo puro a partir de hígado y pulmón de los grupos inoculados con los aislados de prueba, tanto de los aislados rojo congo positivos, rojo congo negativos y del grupo control positivo. Del grupo control negativo no se observaron lesiones, y no se obtuvieron aislados de *E. coli* de hígado y pulmón. El análisis estadístico nos indica que no existen diferencias de patogenicidad entre los

aislados rojo congo positivos, rojo congo negativos y la cepa de referencia. Todos los aislados y la cepa de referencia produjeron lesiones de colibacilosis con valores similares y fueron recuperados de hígado y pulmón (gráficas 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12). En este trabajo el fenotipo rojo congo positivo no estuvo relacionado con la patogenicidad de aislados de *E. coli* aviáres.

Palabras clave: *Escherichia coli*, colibacilosis, patogénica, rojo congo, caracterización, fenotipo, aves ligeras.

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es parte de la microflora normal del intestino de las aves, pero ciertas cepas, tales como aquellas designadas como *Escherichia coli* patogénicas aviarias (APEC), pueden causar infecciones sistémicas o localizadas (Barnes *et al.*, 2003; Da Silveira *et al.*, 2002).

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) están asociadas con infecciones extraintestinales en pollos, pavos, patos y otras especies aviarias, causando una variedad de enfermedades colectivamente conocidas como colibacilosis. (Barnes *et al.*, 2003). La colibacilosis es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria avícola a nivel mundial (Ewers *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2004; Vandekerchove *et al.*, 2004a; Cavero *et al.*, 2009; Zanella *et al.*, 2000).

La colisepticemia es la presentación clínica más importante de la colibacilosis aviar, es caracterizada por una infección respiratoria inicial (aerosaculitis), seguida de una infección generalizada (perihepatitis, pericarditis, peritonitis, salpingitis y septicemia) (Dho Moulin y Fairbrother, 1999; Buxadé, 2000; Ewers *et al.*, 2003; Dho-Moulin *et al.*, 2007).

Aunque la principal vía de entrada es a través del tracto respiratorio, algunas cepas tienen mayor capacidad de propagarse y colonizar fuera de éste, pueden ocurrir infecciones ascendentes desde cloaca a oviducto, considerado el origen cloacal de las cepas patógenas causantes de septicemias en aves y la translocación de *E. coli* del intestino hacia el torrente sanguíneo y órganos, también contribuyen al desarrollo y progresión de la enfermedad (Dozois *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1992; Blanco *et al.*, 1996, 1998; Vidotto *et al.*, 1997; Wooley *et al.*, 1998; Dho Moulin y Fairbrother, 1999; Cavero *et al.*, 2009; Vandekerchove *et al.*, 2004a).

Normalmente la colibacilosis suele ser considerada como una infección secundaria que aparece después de un estado de inmunosupresión causada por otras bacterias, virus, parásitos, factores ambientales o fisiológicos (Cavero *et al.*, 2009; Brée *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1992; Kariyawasam *et al.*, 2002; La Ragione y Woodward, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b). Autores como Nakamura *et al.*, (1992), Barnes *et al.*, (2003); Vandekerchove *et al.*, (2004a, 2004c), describen a la colibacilosis aviar como una entidad propia, defendiendo a *E. coli* como un agente patógeno primario.

Un síndrome distintivo asociado con la colibacilosis fue encontrado en gallinas de postura con una mortalidad súbita, sin haber presentado signos clínicos previos de enfermedad y sin tener efecto sobre la producción y calidad del huevo. A la necropsia las ponedoras presentaron lesiones indicativas de colisepticemia (Cavero *et al.*, 2009; Vandekerchove *et al.*, 2004a, 2004b). La mayoría de los brotes de colisepticemia ocurren alrededor del periodo de pico producción de huevos y la mortalidad puede exceder del 9% durante un simple brote (Vandekerchove *et al.*, 2004a, 2004b).

Las cepas patógenas presentan características diferenciales que no siempre poseen los aislados comensales ni aquellas cepas con baja o escasa patogenicidad (Dozois et al., 1994; Nakamura et al., 1992; Blanco et al., 1996; Vidotto et al., 1997; Wooley et al., 1998; Dho Moulin y fairbrother, 1999). Hay estudios en los que se indica que el 10-15% de la población de bacterias coliformes intestinales pertenece a serotipos patógenos (Barnes et al., 2003). Varios serotipos (incluyendo O1, O2 y O78) causan colibacilosis, varios factores potenciales de virulencia han sido asociados con APEC, incluyendo adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, hemolisinas y toxinas (Blanco et al., 1998; Vandekerchove et al., 2004b; Vandekerchove et al., 2004c).

Es necesario diferenciar entre cepas comunes de *E. coli* y aquellas que producen septicemias en aves domésticas, ya que la colisepticemia es la presentación más importante de la colibacilosis (Buxadé, 2000; Ewers et al., 2003; Dho-Moulin et al., 2007). La afinidad *in vitro* de *E. coli* por el colorante rojo congo, constituye un marcador fenotípico de la virulencia, el cual permite diferenciar presuntivamente entre cepas invasivas y no invasivas a partir de casos clínicos de colibacilosis en las aves (Corbett et al., 1987). El rojo congo es un colorante simple que puede ser fácilmente incorporado en un medio de cultivo agar. Algunas cepas de *E. coli*, así como otras bacterias gram negativas como *Yersinia*, *Aeromonas*, y *Shigella*, activamente se unen al colorante rojo congo cuando las cepas son patogénicas (Berkhoff y Vinal, 1986; Daskaleros y Payne, 1985, 1986; Prpic et al., 1983; Qadri et al., 1988; Surgalla y Beasley, 1969). Las colonias de *E. coli* rojo congo positivas (RC+) son rojo oscuras debido a la unión al colorante. Las colonias rojo congo negativas (RC-) no se unen al colorante y son blanquecinas, se piensa que aquellos aislados de *E. coli* que se unen al rojo congo poseen “propiedades especiales o características especiales” y están asociadas con la colisepticemia (Berkhoff y Vinal, 1986; Corbett et al., 1987; Gjessing y Berkhoff, 1989).

El mecanismo por el cual se realiza la expresión fenotípica RC+, se encuentra relacionado a la presencia de curli. Las fibras curli son adhesinas, un factor de virulencia de *E. coli* que contribuye a la adhesión, internalización e invasión de células eucariotas hospederas. Además las fibras curli están presentes en aquellos aislados de *E. coli* involucrados en la colisepticemia aviar (Gophna et al., 2001; Provence y Curtiss, 1992,1994).

Para probar que el fenotipo RC+ de aislados de *E. coli*, está relacionado con la patogenicidad, es necesario hacer pruebas de patogenicidad *in vivo*, como lo es la prueba desafío en aves. En un estudio realizado por Berkhoff y Vinal, en 1986, se demostró una correlación directa entre la capacidad de algunos aislados de *E. coli* para unirse al colorante rojo congo y su capacidad para producir infecciones septicémicas en pollos. Mostrando que aislados de *E. coli* provenientes de órganos de pollos con colisepticemia fueron RC+ y causaron enfermedad al inocularse

parenteralmente en pollos y ratones. Además, aislados RC- obtenidos a partir de cloaca y tráquea de pollos clínicamente normales no causaron enfermedad al inocularse de forma similar en pollos y ratones. Estos resultados sugieren que la unión de *E. coli* al rojo congo podría ser utilizada como un marcador fenotípico en la diferenciación de cepas invasivas y no invasivas.

Para demostrar aún más la asociación entre el fenotipo y la virulencia de aislados de *E. coli* RC+, Gjessing y Berkhoff, en 1989, realizaron experimentos para reproducir la aerosaculitis y la colisepticemia en pollitos de un día de edad expuestos a un aerosol. En 8 experimentos separados exponiendo un total de 462 pollitos a aislados RC+, la mortalidad fue de 4.11 % y la morbilidad de 13.4%. Tanto los pollitos enfermos como los muertos mostraron lesiones de aerosaculitis fibrinosa, pericarditis y perihepatitis. En contraste, los aislados RC-, cuando se usaron como inóculo por aerosol en 5 experimentos adicionales con 284 pollitos, ningún pollito murió y no se observaron lesiones.

Estos resultados claramente muestran una fuerte correlación entre la expresión del fenotipo RC+ y la patogenicidad de las cepas aviares de *E. coli*. El objetivo del presente estudio es la caracterización fenotípica y patogénica de aislados de *E. coli* obtenidos a partir de aves ligeras con el fin de evaluar la relación entre el fenotipo RC+ y el carácter patogénico de dichos aislados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Escherichia coli (*E. coli*) es la especie tipo del género *Escherichia* (Barnes *et al.*, 2003), cuyas características generales son las siguientes:

- Bacilos Gram negativos, catalasa positivos, oxidasa negativos y lactosa positivos.
- No formadores de esporas.
- Aerobios y anaerobios facultativos, con un amplio rango de temperatura de incubación.
- Inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos.
- Necesidades nutricionales sencillas.

E. coli es la especie bacteriana predominante de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa del aparato digestivo de la mayor parte de los animales y del hombre, por lo que se elimina en las heces al exterior (Margall *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 2004; Todar, 2008). Se trata, dependiendo de los serotipos, de una de las zoonosis alimentarias más frecuentes e importantes en el hombre debido a la gravedad de los cuadros clínicos y al número de afectados, pudiendo suponer un grave riesgo para la salud pública.

Importancia de la colibacilosis

La importancia de la colibacilosis en los animales, radica en las grandes pérdidas económicas que se generan debido a la disminución de determinados parámetros productivos, pérdida de peso, aumento de la mortalidad y los elevados costos de los tratamientos (Blanco *et al.*, 1991,1996; La Ragione y Woodward, 2002).

El criterio que se ha utilizado durante muchos años para diferenciar *E. coli* patógenas de las comensales, ha sido la determinación del antígeno somático, pero ha sido necesario conocer la fórmula antigénica completa, así como la determinación de otras características de virulencia, para considerar a una cepa como patógena (Ewers *et al.*, 2005; Todar, 2008). La mayoría de las *E. coli* patógenas pertenecen a una pequeña gama de serogrupos que incluyen O1:K1, O2:K1 y O78:K80 (Blanco *et al.*, 1998; Vandekerchove *et al.*, 2004b; Vandekerchove *et al.*, 2004c).

Colibacilosis aviar

La colibacilosis aviar es muy importante en las explotaciones de gallinas de postura, ya que representa un serio problema en relación con la salud animal, por ser una de las principales causas de enfermedad, mortalidad y pérdidas económicas en las

granjas avícolas (Ewers *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2004; Vandekerchove *et al.*, 2004a). Este hecho se debe a la frecuencia con la que se presenta y a la disminución de índices productivos y de bienestar animal. (Dho-Moulin *et al.*, 1993; Gyles *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1991; Barnes *et al.*, 2003; Vandekerchove *et al.*, 2004c; Monroy *et al.*, 2005).

Desde finales del siglo pasado se conoce la capacidad de *E. coli* de producir enfermedades en las aves domésticas. En 1885, Theodor Escherich consiguió aislar *E. coli* de muestras clínicas humanas, denominándolo inicialmente como *Bacterium coli commune* (Blanco *et al.*, 1996; Todar, 2008).

Estudios realizados en la década de 1980 sobre los mecanismos de patogenicidad de *E. coli*, confirman la teoría que defiende que aquellas cepas de la microbiota intestinal, que presenten determinados factores de virulencia serían las responsables de provocar enfermedad (Morris y Sojka, 1985; Blanco *et al.*, 1991).

Hasta mediados de la década de 1990, la gran mayoría de los estudios sobre colibacilosis se centraban en la producción de broilers. Es a partir de finales de esta década cuando se decide ampliar el estudio de esta enfermedad, por las grandes pérdidas ocasionadas en el sector avícola de gallinas de postura (Vandekerchove *et al.*, 2004c).

Se han descubierto varios genes implicados en los mecanismos de virulencia de la bacteria, otorgando a las *E. coli* patógenas la denominación específica de *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) (Da Silveira *et al.*, 2002).

Epidemiología

La mayoría de los cuadros clínicos de colibacilosis son de origen respiratorio, aunque no se descarta que algunos ocurran al atravesar las bacterias la pared intestinal (Blanco *et al.*, 1996; Dho-Moulin *et al.*, 2007; Ewers *et al.*, 2004). Mientras la barrera de la mucosa intestinal esté intacta, la microflora normal de las aves es probable que inhiba la translocación de las APEC del intestino al torrente sanguíneo y órganos. Cuando estas barreras son dañadas, posiblemente por el estrés que provoca el inicio de postura o pico de producción, las APEC pueden invadir y causar septicemia (Zanella *et al.*, 2000). Normalmente la mayoría de los brotes de colibacilosis suelen ocurrir en el periodo del pico de producción, donde la mortalidad acumulada puede llegar a superar valores del 10% de la población (Vandekerchove *et al.*, 2004a, 2004b).

La colibacilosis suele ser considerada como una enfermedad secundaria, originada por un estado de inmunodepresión debida a enfermedades, como la bronquitis infecciosa, Newcastle, micoplasmosis o la enfermedad de Gumboro (La Ragione y

Woodward, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b; Nakamura *et al.*, 1990; Vandekerchove *et al.*, 2004a). La presencia de lesiones primarias, como daños en los cilios traqueales y alteraciones en el sistema respiratorio, facilitaría la entrada, colonización y diseminación secundaria de *E. coli* (Blanco *et al.*, 1998). Además de factores de origen infeccioso (virus, bacterias y parásitos), pueden existir otros factores (factores ambientales y fisiológicos) que incrementan la susceptibilidad de las aves para padecer una infección por *E. coli*. También puede haber factores capaces de disminuir dicha susceptibilidad como factores inmunológicos (inmunidad activa y pasiva, adición de inmunoestimulantes) y nutricionales (aporte de proteínas, vitamina A, D, C y E, carotenos, selenio, etc.) (Barnes *et al.*, 2003).

A pesar de ser considerada una enfermedad secundaria, la colibacilosis aviar puede actuar como una entidad propia, este hecho defiende a *E. coli* como un agente patógeno primario (Nakamura *et al.*, 1992; Gross *et al.*, 1991; Barnes *et al.*, 2003; Vandekerchove *et al.*, 2004a, 2004c). Vandekerchove *et al.*, en 2004a, lograron reproducir experimentalmente la enfermedad en aves libres de patógenos específicos (SPF) mediante la inoculación de *E. coli* vía aérea por aerosol, en sacos aéreos y también oralmente, determinando que los brotes con alta mortalidad no se encuentran relacionados necesariamente con otras enfermedades predisponentes, confirmando que las APEC pueden actuar como patógenos primarios.

Además ocurren infecciones ascendentes desde cloaca a oviducto, considerado el origen cloacal de las cepas patógenas causantes de septicemias en aves. Las cepas patógenas presentan características diferenciales que no siempre poseen los aislados comensales ni aquellas cepas con baja o escasa patogenicidad (Morris y Sojka, 1985; Dozois *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1992; Blanco *et al.*, 1996; Vidotto *et al.*, 1997; Wooley *et al.*, 1998; Dho Moulin y Fairbrother, 1999). Hay estudios en los que se indica que el 10-15% de la población de bacterias coliformes intestinales pertenece a serotipos patógenos (Barnes *et al.*, 2003). Se sabe que las cepas patogénicas pueden diseminarse ampliamente por la formación de polvo y aerosoles a partir de las heces contaminadas y adherirse a las células del epitelio del tracto respiratorio superior mediante fimbrias F1, iniciándose la colonización bacteriana. *E. coli* persistirá por largos periodos fuera del organismo de las aves en ambientes secos, en condiciones polvosas y puede contaminar además el agua de bebida (Dozois *et al.*, 1994; McPeake *et al.*, 2005).

En las aves, las zonas de intercambio de oxígeno de los sacos aéreos y de los pulmones son dos puntos altamente susceptibles a la colonización e invasión bacteriana, debido a la inexistencia de macrófagos alveolares que puedan contener la infección a este nivel y a que la barrera existente entre la región capilar aérea y la sangre es extremadamente delgada (Blanco *et al.*, 1996; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b). Posteriormente se produce la diseminación de *E. coli* a través del torrente

sanguíneo y la colonización de órganos internos, gracias a la capacidad de adhesión mediada por fimbrias P (que se expresan en el tracto respiratorio inferior y en los órganos internos), es decir, en fases más avanzadas de la infección (Barnes *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005; Monroy *et al.*, 2005).

La contaminación fecal de los huevos puede resultar en una penetración de *E. coli* a través del cascarón, se ha estimado que en algunos casos (0.5-6%) de los huevos pueden contener la bacteria. *E. coli* puede diseminarse a otros pollos durante la cría y es generalmente asociado con altas tasas de mortalidad, o esto puede aumentar las infecciones del saco vitelino (Barnes *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005; Monroy *et al.*, 2005).

Formas de presentación de la colibacilosis

Las APEC inducen diferentes presentaciones de la colibacilosis aviar, incluyendo infecciones sistémicas y localizadas, como la respiratoria, colisepticemia, salpingitis, peritonitis, infección del saco vitelino. La presentación más común de la colibacilosis aviar es caracterizada por una infección respiratoria inicial (aerosaculitis) dentro de las 3-12 semanas de edad de las aves, que por lo general es seguida de una infección sistémica con lesiones septicémicas características (aerosaculitis, pericarditis, perihepatitis, salpingitis, peritonitis) y septicemia (Gross *et al.*, 1991, 1994; Barnes *et al.*, 2003; Dho-Moulin y Fairbrother, 1999; Buxadé, 2000; Ewers *et al.*, 2003; Dho-Moulin *et al.*, 2007).

Forma respiratoria

La colibacilosis, suele iniciarse a nivel del tracto respiratorio. La alteración de la mucosa del aparato respiratorio, debida a la acción de determinados agentes, supone una importante vía de entrada para *E. coli* (Barnes *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b). Cuando *E. coli* atraviesa la mucosa del tracto respiratorio y alcanza el torrente sanguíneo, se origina una infección sistémica generalizada o colisepticemia (Blanco *et al.*, 1996; Kariyawasam *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b; Vandekerchove *et al.*, 2004c; McPeake *et al.*, 2005; Dho-Moulin *et al.*, 2007). A nivel respiratorio las lesiones se localizan en la tráquea, pulmones y sacos aéreos, pudiendo presentar estos últimos un aspecto opaco y con exudado caseoso de intensidad variable. Suele afectar a animales jóvenes, de forma aguda, alcanzándose valores aproximados del 50% de morbilidad y del 5-10% de mortalidad. Entre los signos clínicos que se manifiestan, se puede observar dificultad respiratoria o disnea acompañada de estertores (Barnes *et al.*, 2003).

Forma genital o reproductora

La vía de infección del oviducto suele producirse de forma ascendente a partir de la cloaca o bien una infección producida a partir del tracto respiratorio por invasión, diseminación y colonización de órganos internos e incluso por el paso de las bacterias a través del lumen intestinal y difusión por contacto entre el intestino y el oviducto (Landman y Cornelissen, 2006a, 2006b).

Es una enfermedad crónica y de curso lento, con una mortalidad en torno al 2-3%. Los rendimientos productivos de las gallinas ponedoras disminuyen ya que se produce una leve caída de la producción (Vandekerchove *et al.*, 2004c). El oviducto presenta una notable congestión y dilatación de la mucosa pudiendo encontrar un contenido purulento en el interior, incluso masas caseosas, en animales mayores (Blanco *et al.*, 1996). Aunque pueden presentarse de modo independiente, la forma clínica más frecuente es una combinación de salpingitis con peritonitis. La peritonitis suele observarse más en cuadros agudos que en formas crónicas, mientras que la salpingitis puede presentarse en ambos casos (Jordan *et al.*, 2005).

Otras formas de presentación menos frecuentes de la colibacilosis:

Enteritis: habitualmente suele existir una lesión primaria a nivel intestinal debido a la acción de virus entéricos (Barnes *et al.*, 2003), lo que se convierte en un excelente factor predisponente para *E. coli*. Se produce una fuerte inflamación del intestino, enteritis catarral, acompañada de un engrosamiento de la pared. El principal signo es una diarrea severa acompañada de mucosidad excesiva (Vandekerchove *et al.*, 2004c).

Sinovitis y artritis: se produce una inflamación a nivel de los tendones y articulaciones de las aves (Blanco *et al.*, 1996; Vandekerchove *et al.*, 2004c). Puede afectar a los espacios vertebrales causando espondilitis e incluso cursar con parálisis. Suele producirse tras una colisepticemia y en combinación con otros microorganismos, como los pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* (*S. aureus*) y *Mycoplasma* (*M. synoviae*) (Barnes *et al.*, 2003).

Coligranuloma:(enfermedad de Hjärre) se presenta ocasionalmente y se caracteriza por la aparición de nódulos de tamaño considerable en el hígado, ciego, duodeno y mesenterio. Aunque los signos y lesiones dependen de la extensión del tejido afectado, suele diagnosticarse sólo a través de la necropsia (Blanco *et al.*, 1996).

Infeción del saco vitelino: la infección del huevo en formación se produce gracias a la transmisión transovárica generándose una infección del saco vitelino, produciendo un incremento de la mortalidad embrionaria y durante la primer semana de vida del polluelo (Blanco *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 2003).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de la colibacilosis puede realizarse en función de la signología y aunque las lesiones son bastante significativas, siempre es conveniente realizar la confirmación mediante el análisis bacteriológico de las muestras tomadas (Landman *et al.*, 2006a, 2006b). Existen medios de cultivo selectivos diferenciales como el agar MacConkey. Se utiliza fundamentalmente para el aislamiento de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y diferenciación de *E. coli* de otros patógenos intestinales de la misma familia. Los componentes selectivos lo constituye el cristal violeta (inhibidor de los microorganismos Gram positivos) y las Sales Biliares (Gomis *et al.*, 2001; Radu *et al.*, 2001; Da Silveira *et al.*, 2002; Jeffrey *et al.*, 2002; Rodríguez-Angeles, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Skyberg *et al.*, 2003; Siek *et al.*, 2005a, 2005b). La identificación a nivel de género y especie suele realizarse con pruebas bioquímicas convencionales, tras un examen de la morfología y el crecimiento bacteriano (Barnes *et al.*, 2003). Una alternativa a los métodos convencionales, son los sistemas comerciales automatizados, que permiten una identificación rápida y fiable de todas las especies de Enterobacterias con significación clínica, por ejemplo, los sistemas multisustratos de identificación bioquímica (Kariuki *et al.*, 1999; Skyberg *et al.*, 2003) como las galerías API®, API20E, BioMérieux.

Factores de virulencia de *E. coli*.

Existen atributos de virulencia en APEC que las diferencia de otras *E. coli* no patógenas, son los factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad. La virulencia de *E. coli* es multifactorial, es decir, depende de la acción combinada de numerosos factores o genes de virulencia. Estudios genéticos demuestran la presencia de numerosas recombinaciones y transferencia horizontal de genes, señalando una vez más, la gran diversidad de factores de virulencia (Nataro y kaper, 1998; Kariyawasam *et al.*, 2002; Siek *et al.*, 2005a, 2005b; Johnson *et al.*, 2004).

Algunos factores son más prevalentes en cepas patógenas de *E. coli*, pudiendo actuar como marcadores relativos de patogenicidad, permitiendo así detectar y caracterizar a las cepas patogénicas. Varios factores de virulencia potenciales son asociados con APEC, incluyendo la producción de colicinas, secuestro de hierro (aerobactina), resistencia al efecto bactericida del suero, antígeno capsular K1 y adhesinas (Ewers *et al.*, 2004, 2005; Johnson *et al.*, 2006a, 2006b; Dozois *et*

al., 2000; Pfaff-McDonough *et al.*, 2000; Da Silveira *et al.*, 2002; La Ragione y Woodward, 2002; Delicado *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b; Skyberg *et al.*, 2003).

Adhesinas

Las cepas APEC se adhieren a las células epiteliales de la faringe y tráquea por medio de fimbrias tipo 1, que comprende una subunidad principal estructural, FimA, y una subunidad menor, FimH, que median la adhesión a residuos D-manosa (Ewers *et al.*, 2004; McPeake *et al.*, 2005). Las fimbrias tipo 1, se expresan cuando la bacteria coloniza el tracto respiratorio superior, tráquea, pulmones y sacos aéreos de las aves infectadas, pero no se expresan en órganos internos o torrente sanguíneo (La Ragione *et al.*, 2000; Delicato *et al.*, 2003). Esto podría explicar su posible papel en los primeros estadios de la infección y su relación con la virulencia (Dozois *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 2003; Monroy *et al.*, 2005; Skyberg *et al.*, 2003). En cambio, las fimbrias P parece que juegan un papel más importante en fases avanzadas de la infección, son expresadas cuando la bacteria coloniza los sacos aéreos, los pulmones y órganos internos, pero no se expresa cuando la bacteria coloniza la tráquea (Pourbakhsh *et al.*, 1997a, 1997b; La Ragione *et al.*, 2000; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b). Dozois *et al.*, en 1995, comprobaron la inexistencia de receptores para fimbrias P en tráquea de pollos, por tanto, no se produciría su adhesión a nivel del tracto respiratorio superior. De este modo, se sugiere que podrían participar en la colonización de órganos internos favoreciendo el desarrollo de la septicemia (Pourbakhsh *et al.*, 1997a, 1997b; La Ragione *et al.*, 2000; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b).

Las fibras curli, son fibras amiloides expresadas en la superficie de *E. coli*, *Salmonella* y muchas otras enterobacterias, son altamente agregativas, miden de 2-6 nm de diámetro y contribuyen a la internalización, adhesión e invasión de la bacteria a células eucariotas hospederas. Las fibras curli son expresadas por muchos aislados patogénicos de *E. coli* y estos aislados son involucrados en la colisepticemia aviar (Olsen *et al.*, 1989; Provence y Curtiss, 1992). Proteínas de superficie similares fueron identificadas en *Salmonella* entérica en ambos serovares *Enteritidis* y *Typhimurium* (Römling *et al.*, 1998; Colliston *et al.*, 1996).

Sistema de captación y liberación de hierro

El hierro resulta limitante para el crecimiento bacteriano. Su baja concentración se debe a que un gran porcentaje se encuentra secuestrado en hemoproteínas o en proteínas quelantes del hierro relacionadas con su transporte, como la transferrina o la lactoferrina. Para la obtención del hierro, las *E. coli* aviares cuentan con sistemas de captación como los mediados por el sideróforo aerobactina gracias al cual capta y concentra el hierro libre (Delicato *et al.*, 2003; Monroy *et al.*, 2005;

Ewers *et al.*, 2004; McPeake *et al.*, 2005). Se trata de un factor claramente vinculado con la virulencia de los aislados (Bolin, 1986; Skyberg *et al.*, 2003; Rakin *et al.*, 1995).

Resistencia al efecto bactericida del suero

Numerosos estudios hacen referencia a la correlación positiva entre la supervivencia aumentada en suero y la virulencia, demostrando la importancia de la presencia del gen *iss* en las cepas patógenas de *E. coli* (Ellis *et al.*, 1988; Ferreira y Silva, 1991; Wooley *et al.*, 1992; Nolan *et al.*, 1992a, 1992b; Ptaff-McDonough *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2003; Delicato *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b; Skyberg *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005). Se trata de un factor frecuentemente detectado en aislados patógenos de origen aviar (Vandekerchove *et al.*, 2005). Tras los primeros estadios de la infección, *E. coli* llega al torrente sanguíneo y es en esta localización donde debe resistir a la actividad lítica del complemento sérico. Se cree que a esta resistencia contribuyen algunos antígenos (O y K) y determinadas proteínas presentes en la membrana externa de la pared celular bacteriana (Blanco *et al.*, 1996; Monroy *et al.*, 2005). El antígeno capsular K1 es asociado con APEC, particularmente de serogrupos O1 y O2. Se ha demostrado que cepas APEC K1+ son más resistentes al efecto bactericida del suero que otras cepas APEC que expresan otro tipo de antígenos K (Pourbakhsh *et al.*, 1997a, 1997b).

Producción de colicinas

Las colicinas son sustancias producidas por algunas cepas de *E. coli* que resultan tóxicas para otras cepas de la misma especie e inhiben su crecimiento por competencia. Por tanto, es posible que las cepas patógenas productoras de colicinas pudieran tener una mayor persistencia que las cepas avirulentas (Barnes *et al.*, 2003). La presencia de este factor se consideraría como un indicador de virulencia (Delicato *et al.*, 2003; Vandekerchove *et al.*, 2005). En un estudio realizado con aislados de *E. coli* en Brasil comprobaron que el 89% de las cepas patógenas producían colicinas, frente al 11% de las cepas no letales (Blanco *et al.*, 1996).

Medidas de control y prevención

Para prevenir la colibacilosis es imprescindible conocer y eliminar las fuentes de contaminación así como evitar factores predisponentes que contribuyan a la aparición de la enfermedad (Barnes *et al.*, 2003; Biarnés, 2006). Estos parámetros, cuando no son adecuados, tienen una gran repercusión en el bienestar animal e influyen negativamente en la producción, incrementando la susceptibilidad a las infecciones por *E. coli* (Blanco *et al.*, 1996; 1998; La Ragione y Woodward, 2002). La prevención de la colibacilosis puede llevarse a cabo mediante el control y

vigilancia de los siguientes factores fundamentales (Barnes *et al.*, 2003). Manejo: densidad de animales correcta, ventilación eficaz, ausencia de suciedad y polvo, retirada periódica de gallinaza, intensidad lumínica y temperaturas adecuadas, suministro de agua y alimento adecuados, programas de desinfección, desinsectación y desratización adecuados. El polvo con contaminación fecal se considera una de las principales vías de infección y diseminación de la enfermedad (Blanco *et al.*, 1996).

Profilaxis y estatus sanitario: debe minimizarse la incidencia de enfermedades como la coccidiosis, bronquitis infecciosa, enfermedad de Newcastle, Gumboro, *M. gallisepticum*, *M. synoviae* y micosis, ya que son enfermedades que predisponen al desarrollo de la colibacilosis. Por tanto, los programas de vacunación deben ser los adecuados para la explotación. (Brée *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1992; La Ragione y Woodward, 2002; Mellata *et al.*, 2003a, 2003b). Existen en el mercado varias vacunas inactivadas frente a *E. coli* pero es importante tener en cuenta que la vacuna sólo protege eficazmente frente a las cepas homólogas de *E. coli* y no frente a cepas heterólogas de otros serotipos, quizá debido al elevado número de serotipos existentes (Buxadé, 2000; Biarnés, 2006). Además se han realizado estudios de valoración de los antígenos óptimos para la elaboración de las vacunas, como adhesinas F1 y P, proteína receptora de aerobactina y lipopolisacáridos (LPS) obtenidos de la cepa *E. coli* O78, demostrando su relevancia a la hora de proteger contra las infecciones del tracto respiratorio causada por cepas patógenas de *E. coli* (Kariyawasam *et al.*, 2002).

Los programas de nutrición: es importante la aplicación de fórmulas nutricionales correctas para cada fase de producción, así como un buen suministro de alimento a los animales. Un suministro incorrecto del alimento podría provocar estrés en los animales favoreciendo la aparición de enfermedades. La realización de controles del alimento y materias primas es esencial para garantizar una buena calidad (Barnes *et al.*, 2003).

Terapia antimicrobiana: es una herramienta indispensable para reducir las importantes pérdidas ocasionadas por las infecciones por *E. coli* en la industria avícola (Amara *et al.*, 1995). *E. coli* posee la sensibilidad característica de las bacterias Gram negativas, siendo parte de las cepas sensibles a penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, colistina, sulfamidas, trimetoprim y quinolonas (Barnes *et al.*, 2003). Se ha demostrado que varios factores contribuyen a la virulencia de las cepas aviares de *E. coli*, y muchos se encuentran alojados en plásmidos de conjugación de gran tamaño. En ellos, también pueden encontrarse genes responsables de resistencia a agentes antimicrobianos, y es posible que el uso de éstos seleccione de manera específica las cepas de *E. coli* que contienen estos plásmidos, aumentando así la persistencia de las mismas entre las aves (Johnson *et al.*, 2004). Además la utilización masiva

de antimicrobianos junto con la práctica habitual de utilizarlos a concentraciones sub-inhedorias con fines profilácticos, ha incrementado considerablemente las resistencias bacterianas (Ginns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005; Biarnés, 2006). La utilización inadecuada de antimicrobianos puede seleccionar cepas bacterianas resistentes a los mismos, ya sean o no patógenas. Las bacterias responden ante la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos de forma que en el nuevo ambiente sólo sobreviven aquellas más aptas en sentido evolutivo, es decir los más resistentes (Johnson *et al.*, 2004; Schroeder *et al.*, 2004).

III. JUSTIFICACIÓN

La colisepticemia es la forma clínica más común y grave de la colibacilosis, responsable de pérdidas económicas significativas en la industria avícola mexicana y mundial. Por lo cual es necesario diferenciar entre las cepas comunes de *E. coli* y aquellas que producen septicemia en aves domésticas. En este trabajo se estudia el carácter patogénico de aislados de *E. coli* y su relación con el fenotipo rojo congo positivo. Lo anterior surge de la necesidad de tener una herramienta de diagnóstico sencilla para la identificación de cepas patogénicas de *E. coli*.

IV. HIPÓTESIS

Existe relación entre la patogenicidad y el fenotipo rojo congo positivo de aislados de *E. coli* aviáres.

V. OBJETIVOS

General: Evaluar la patogenicidad de aislados de *E. coli* aviáres y su relación con el fenotipo rojo congo.

Específicos: Determinar la capacidad patogénica de los aislados de *E. coli* rojo congo positivos mediante pruebas de desafío.

Determinar la capacidad patogénica de los aislados de *E. coli* rojo congo negativos mediante pruebas de desafío.

VI. MATERIAL

Material Biológico

50 hisopados del interior del intestino de aves ligeras.

50 hisopados del interior del saco vitelino de aves ligeras.

Aislamientos de *E. coli*

Cepas de referencia: de *E. coli* (ATCC 8739)

Aves SPF

Huevos embrionados SPF

Medios de cultivo

Base de agar Sangre (DIFCO)

Infusión cerebro corazón (DIFCO)

Agar MacConkey (DIFCO)

Glicerol

Agar Rojo Congo

Agar de soya tripticasa

Caldo de soya tripticasa

Medio de transporte comercial (stuart)

Pruebas Bioquímicas convencionales

TSI

SIM

Urea

Mio

Carbohidratos diversos

Sistema API 20E (Biomeriux)

Reactivos

Oxidasa

Catalasa

Kovac

Cristal violeta

Yodo

Alcohol acetona

Safranina

Equipo.

Estufa bacteriológica Odds Ratio

Microscopio binocular Boeco Germany

Autoclave vertical

VII. MÉTODO

Características de la población

Para la realización del presente trabajo se analizaron muestras procedentes de órganos internos de pollitas ligeras, línea Bovans. Se procesaron 50 hisopados del interior del saco vitelino y 50 del interior del intestino de aves ligeras de 1 a 5 días de edad. Las muestras fueron tomadas de una granja de crianza perteneciente a una empresa avícola productora de huevo para consumo, situada en el municipio de Lagos de Moreno, Jal.

Condiciones de muestreo

El muestreo fue aleatorio, las aves sé tomaron al azar, aparentemente sanas y del mismo lote.

Toma de muestras

Las pollitas se sacrificaron humanitariamente, mediante dislocación de las vértebras cervicales, de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Se realizó la necropsia y toma de muestras mediante hisopos estériles con vástago de plástico y medio de transporte de Stuart, para el aislamiento bacteriológico.

Las muestras se procesaron el mismo día de la toma.

Aislamiento e identificación de *E. coli*.

El protocolo de aislamiento bacteriológico aplicado a las muestras fue el siguiente:

1. Siembra de los hisopos tomados en agar MacConkey e incubación de las placas en condiciones de aerobiosis a una temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 22 ± 2 horas.
2. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la selección de colonias sospechosas de *E. coli* por su morfología y viraje en el medio agar MacConkey (colonias púrpuras). Se seleccionó una colonia por muestra y se subcultivó en agar sangre con 5% de sangre de cordero, para la obtención de cultivos puros. Estas placas se incubaron a una temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 22 ± 2 horas en condiciones de aerobiosis.

Posteriormente, se procedió a la identificación bioquímica de las colonias sospechosas de pertenecer al género *Escherichia*.

Identificación bioquímica de los aislados

La identificación a nivel de especie de los aislados sospechosos, se determinó mediante la realización de una batería de pruebas bioquímicas en tubo, utilizando los medios: TSI, MIO, SIM y UREA. Además de realizar la prueba de oxidasa. Para confirmación de las bioquímicas se usó el sistema API-20E *Enterobacteriaceae* System. Se utilizó como control una cepa de *E. coli* patogénica aviar (APEC) ATCC 8739.

Conservación y mantenimiento de los aislados obtenidos.

Los aislados identificados se inocularon en criotubos con brain heart infusión (BHI), para su conservación a - 83 °C.

Inoculación de aislados de E. coli en agar rojo congo.

Todos los aislados mantenidos en congelación a – 83 °C se reactivaron en BHI durante 24 horas a 37 °C y posteriormente se inocularon en placas de agar MacConkey y agar sangre para comprobar la viabilidad y pureza de los mismos aislados.

Una vez realizadas las pruebas de viabilidad y pureza los aislados fueron inoculados en placas de agar rojo congo, e incubados por 24 horas a 37 °C. El medio rojo congo se preparó como describen Panigrahy y Yushen, en 1990. Transcurrido el tiempo de incubación se revisó el crecimiento de los aislados inoculados en las placas de agar rojo congo. Los aislados de *E. coli* se identificaron fenotípicamente como RC+ o RC- por el aspecto de las colonias en el agar rojo congo (Berkhoff y Vinal, 1986).

Preparación de inóculos

Una vez realizadas las pruebas de calidad y la prueba de rojo congo se seleccionaron 5 aislados RC+ (18-SV, 26-SV, 30-SV, 42-SV, 48-SV) y 5 RC- (9-IN, 14-IN, 17-IN, 18-IN, 23-IN) para la elaboración de los inóculos de desafío. Estos aislados seleccionados, así como la cepa de referencia de *E. coli* (ATCC 8739) se inocularon en placas de agar MacConkey con Gentamicina con la finalidad de marcarlos (hacerlos Gentamicina resistentes).

El proceso para la obtención de aislados resistentes a la Gentamicina fue el siguiente:

Se inocularon los aislados de interés y la cepa de referencia en agar MacConkey conteniendo Gentamicina (30 µg/ml de medio), y se incubaron de 48 a 72 horas. Las placas se revisaron cada 24 horas, de aquellas colonias que crecieron en el medio con él antimicrobiano, se realizaron pruebas bioquímicas para verificar la especie (Sahm y Washington, 1985; Vera, 1988).

Posteriormente estos mismos se inocularon en placas de trypticasa-soya agar con Gentamicina (30 µg/ml de medio) con el fin de obtener un crecimiento abundante y a partir de estos cultivos resistentes a la Gentamicina se elaboraron los inóculos de desafío (Sahm y Washington, 1985; Vera, 1988).

Los 10 aislados de *E. coli* y la cepa de referencia Gentamicina resistentes, se propagaron en caldo de soya tripticasa contenidos en tubos con tapa de rosca de 18ml, incubados a 37 ° C durante dos y media horas con la finalidad de obtener un título aproximado de 1×10^7 UFC (unidades formadoras de colonias) por cada ml (Panigrahy y Yushen, 1990). Estos cultivos se utilizaron para la prueba desafío.

Pruebas de patogenicidad por desafío

Para el desafío se utilizaron pollas ligeras de 10 semanas de edad.

Se formaron 12 grupos de pollas, cada grupo de 15 individuos, cada uno de los 10 aislados de *E. coli* gentamicina resistentes se inoculó en un grupo de pollas (un aislado por cada grupo), Otro grupo fue inoculado con la cepa de referencia y se usó como control positivo. La vía de inoculación utilizada fue la endotraqueal, .2 ml de inóculo por cada ave.

El grupo restante fue inoculado de forma similar con caldo de soya tripticasa estéril, .2 ml de caldo estéril por ave y este grupo se usó como control negativo.

Cada grupo se mantuvo separado en jaulas, con un adecuado manejo de la alimentación y bioseguridad. Las aves se abastecieron con alimento comercial sin antibióticos y agua a libre acceso durante el experimento.

Los grupos de aves inoculados fueron observados diariamente durante tres días post-inoculación para observar signos clínicos, pero ningún grupo presentó signos de enfermedad. Después de cumplidos los tres días, las aves se sacrificaron humanitariamente y se les practico la necropsia para observar lesiones (Berkhoff y Vinal, 1986; Gjessing y Berkhoff, 1989; Panigrahy y Yushen, 1990).

Se tomaron hisopados de hígado y pulmón de todas las aves y se inocularon en agar MacConkey conteniendo Gentamicina para el aislamiento de *E. coli*. Estas placas se incubaron a 37 °C durante 24 hrs y se hizo la revisión de cultivos cumpliéndose este tiempo de incubación.

Los aislados de *E. coli* que produjeron lesiones (aerosaculitis, peritonitis, neumonía, etc) y que se recuperaron de hígado y pulmón son considerados como patogénicos (APEC). Y aquellos aislados que no produjeron lesiones y no se recuperaron de hígado y pulmón son considerados como no patogénicos (Berkhoff y Vinal, 1986; Gjessing y Berkhoff, 1989; Panigrahy y Yushen, 1990).

Método Estadístico

El presente estudio utilizó como diseño experimental el diseño completamente al azar con diferente número de unidades por tratamiento. El diseño completamente al azar, es un diseño adecuado para experimentos en laboratorios, en que las condiciones ambientales son controladas, es un diseño con un solo criterio de clasificación. Este diseño se plantea cuando se han perdido unidades experimentales y no se dispone con igual número de observaciones por tratamiento.

Análisis de resultados

Los resultados fueron evaluados utilizando un análisis de varianza con una confiabilidad del 95%, para un diseño completamente al azar con grupos no homogéneos por pérdida de unidades experimentales.

VIII. LÍMITE DE TIEMPO

El presente trabajo se llevó a cabo dentro del periodo de Enero del 2016 a Enero del 2017.

IX. LÍMITE DE ESPACIO

El trabajo se realizó en el área aves del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma del Estado de México, situado en el Km 15.5 de la carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, coordenadas, Latitud Norte 19° 23' 57", latitud oeste 99° 42' 47".

X. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó la capacidad patogénica de 10 aislados de *E. coli* obtenidos de aves ligeras, 5 aislados fueron RC+ y 5 RC-. La capacidad patogénica fue evaluada mediante el desafío de aves ligeras aparentemente sanas, con el fin de establecer la relación entre el fenotipo RC+ y el carácter patogénico de dichos aislados. Fueron inoculados 10 grupos de aves con los aislados RC+ y RC-, un grupo inoculado con la cepa de referencia sirvió como control positivo, otro grupo fue inoculado con caldo de soya tripticasa estéril y fue utilizado como control negativo. El criterio utilizado para identificar los aislados patogénicos fue la observación de lesiones compatibles con colibacilosis mediante la necropsia de las aves desafiadas, y el aislamiento bacteriológico de *E. coli* a partir de hígado y pulmón.

Los grupos desafiados fueron identificados con letras mayúsculas y cada aislado se inoculó en un grupo diferente, como se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 1. Identificación de los grupos, aislado inoculado y fenotipo al que pertenece cada aislado.

GRUPO DESAFÍO	AISLADO INOCULADO	FENOTIPO
GRUPO A	48-SV	Rojo congo +
GRUPO B	42-SV	Rojo congo +
GRUPO C	30-SV	Rojo congo +
GRUPO D	26-SV	Rojo congo +
GRUPO E	18-SV	Rojo congo +
GRUPO F	23-IN	Rojo congo -
GRUPO G	18-IN	Rojo congo -
GRUPO H	17-IN	Rojo congo -
GRUPO I	14-IN	Rojo congo -
GRUPO J	9-IN	Rojo congo -
GRUPO K (control +)	ATCC 8739	
GRUPO L (control -)	Medio de cultivo estéril	

Las lesiones observadas fueron aerosaculitis, peritonitis, congestión pulmonar, edema pulmonar y neumonía fibrinopurulenta.

Los resultados obtenidos en la necropsia se muestran en la tabla siguiente.

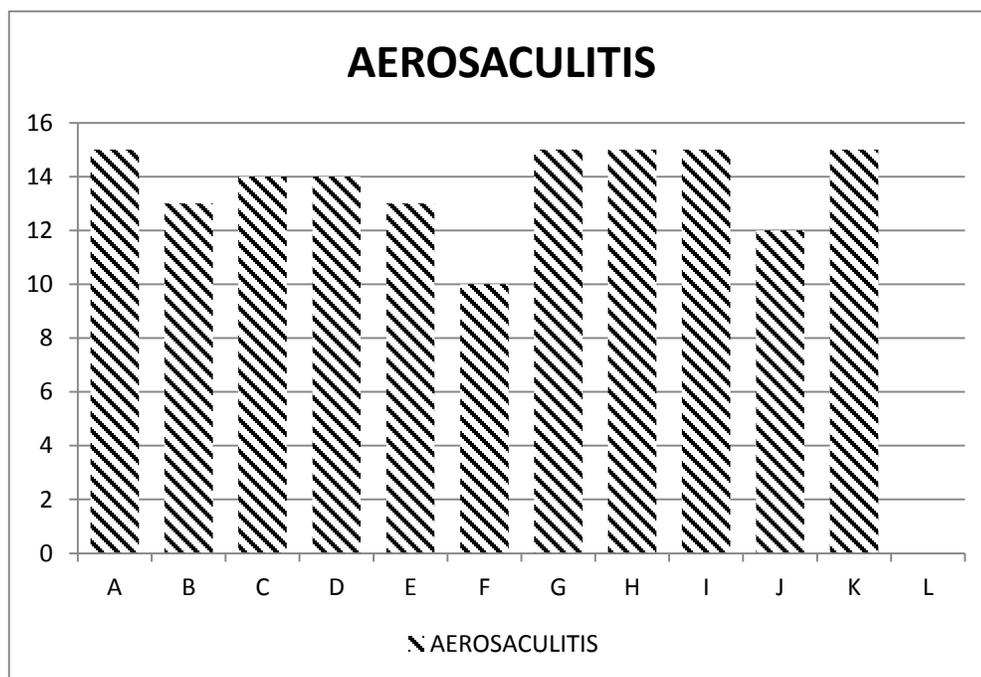
Tabla 2. Resultados observados a la necropsia de los grupos de desafío, control positivo y control negativo.

Tabla de resultados a la necropsia

	AEROSACULITIS	PERITONITIS	NEUMONIA FIBRINOPURULENTA	EDEMA DE PULMÓN	CONGESTIÓN PULMÓN	Sumatoria	Promedio
A (RC+)	15	10	11	13	12	61	12.2
B (RC+)	13	11	7	14	12	57	11.4
C (RC+)	14	13	8	9	12	56	11.2
D (RC+)	14	13	9	14	14	64	12.8
E (RC+)	13	10	12	13	15	63	12.6
F (RC-)	10	10	9	8	11	48	9.6
G (RC-)	15	11	13	12	14	65	13.0
H (RC-)	15	13	13	8	15	64	12.8
I (RC-)	15	15	9	13	15	67	13.4
J (RC-)	12	5	9	5	14	45	9.0
K (control +)	15	15	15	15	15	control (+)	
L (control -)	0	0	0	0	0	control (-)	

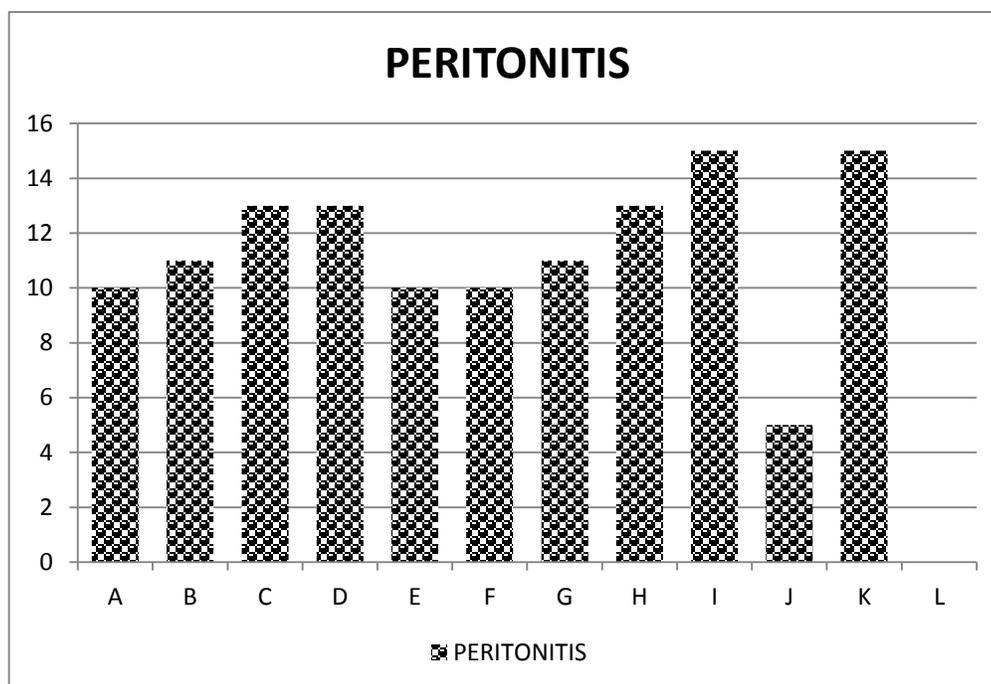
A continuación se muestran las gráficas de cada lesión observada, en los diferentes grupos de desafío.

Gráfica 1. Aerosaculitis observada en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo.



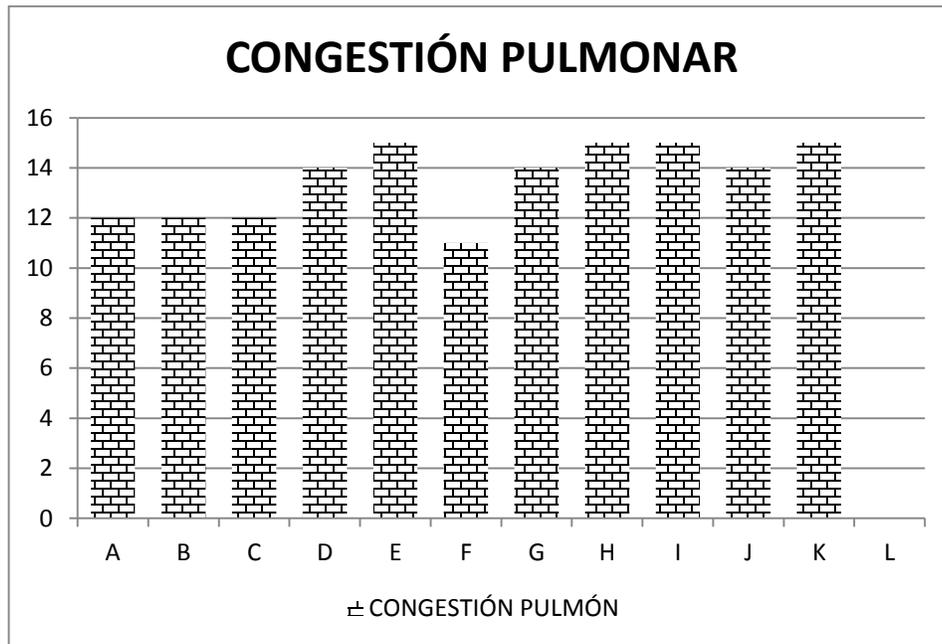
No se observan diferencias en la gráfica de aerosaculitis entre los grupos de desafío (A- J) y el grupo control positivo (K). Existe diferencia con el grupo control negativo (L), el cual no presentó esta lesión.

Gráfica 2. Peritonitis observada en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo.



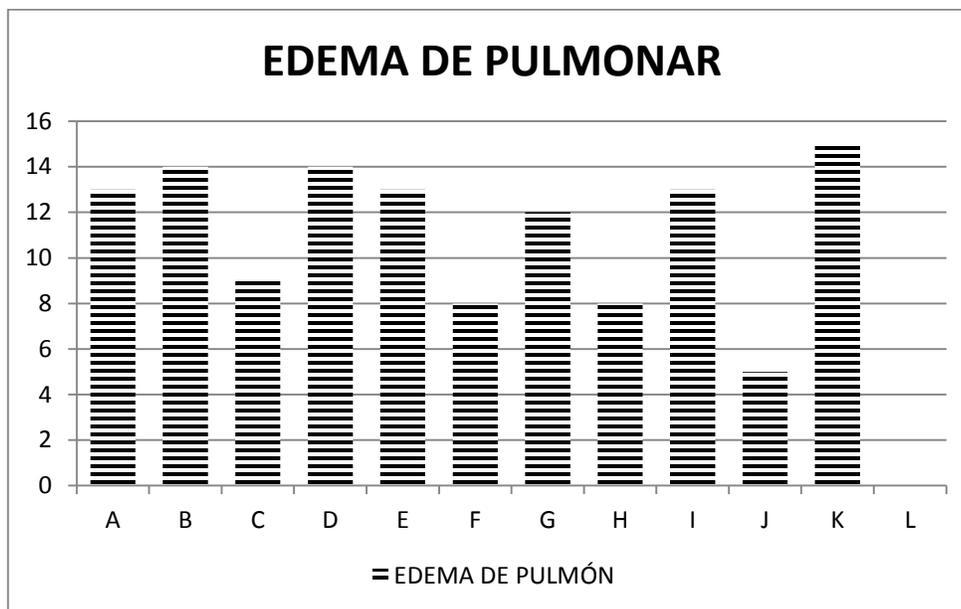
No se observan diferencias en la gráfica de peritonitis entre los grupos de desafío (A- I) y el grupo control positivo (K). El grupo (J) presentó menor porcentaje de aves con peritonitis a la necropsia. Existe diferencia con el grupo control negativo (L), el cual no presentó esta lesión.

Gráfica 3. Congestión pulmonar observada en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo.



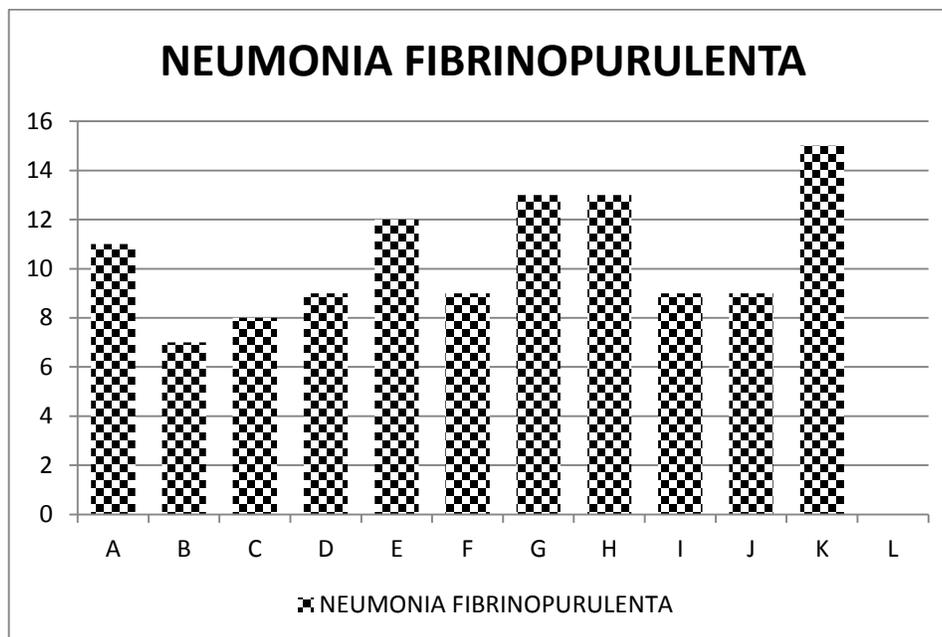
No se observan diferencias en la gráfica de congestión pulmonar entre los grupos de desafío (A- J) y el grupo control positivo (K). Existe diferencia con el grupo control negativo (L), el cual no presentó esta lesión.

Gráfica 4. Edema pulmonar observado en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo.



No se observan diferencias en la gráfica de edema pulmonar entre los grupos de desafío (A- I) y el grupo control positivo (K). El grupo (J) presentó menor porcentaje de aves con edema pulmonar a la necropsia. Existe diferencia con el grupo control negativo (L), el cual no presentó esta lesión.

Gráfica 5. Neumonía fibrinopurulenta observada en los diferentes grupos de desafío, controles positivo y negativo.



No se observan diferencias en la gráfica de neumonía fibrinopurulenta entre los grupos de desafío (A- J) y el grupo control positivo (K). Existe diferencia con el grupo control negativo (L), el cual no presentó esta lesión.

Los resultados observados a la necropsia de los 10 grupos de desafío, en los que se probaron los aislados de *E. coli* RC+ y RC- de interés, fueron comparados unos con otros. Para lo cual se realizó un análisis de varianza por cada lesión observada, de igual forma para los resultados del aislamiento bacteriológico de *E. coli* a partir de pulmón e hígado.

Los grupos control positivo y control negativo resultaron positivo y negativo respectivamente para cada una de las lesiones, y para el aislamiento bacteriológico, funcionando adecuadamente como controles, por ello no fue necesario que se compararan estadísticamente con los grupos de desafío.

Los resultados estadísticos obtenidos se muestran a continuación.

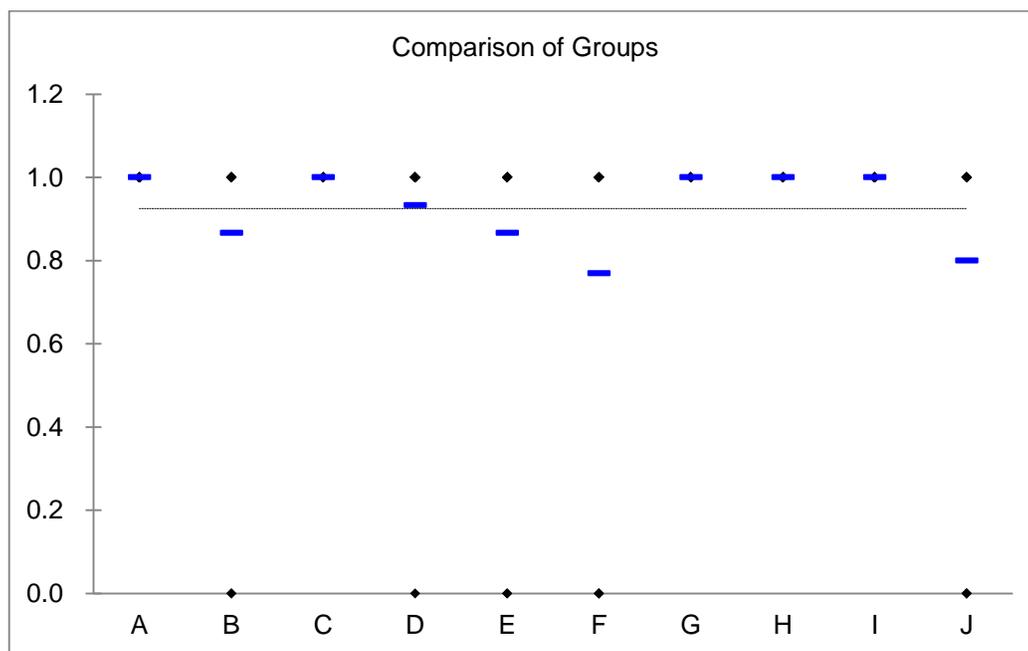
Aerosaculitis.

Tabla 3. Tabla de ANOVA para aerosaculitis.

Tabla ANOVA						
	<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>g.l.</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
	Tratamiento	1.07	9	0.119	1.79	.0760
	Error	9.11	137	0.066		
	Total	10.18	146			

P>0.05

Grafica 6. Comparación de medias de los grupos de desafío. Con análisis para aerosaculitis.



Estadísticamente no existe diferencia entre los diferentes grupos de desafío ya que todos los aislados inoculados produjeron aerosaculitis con valores similares, y se observa en la gráfica que todos están cercanos a la media promedio.

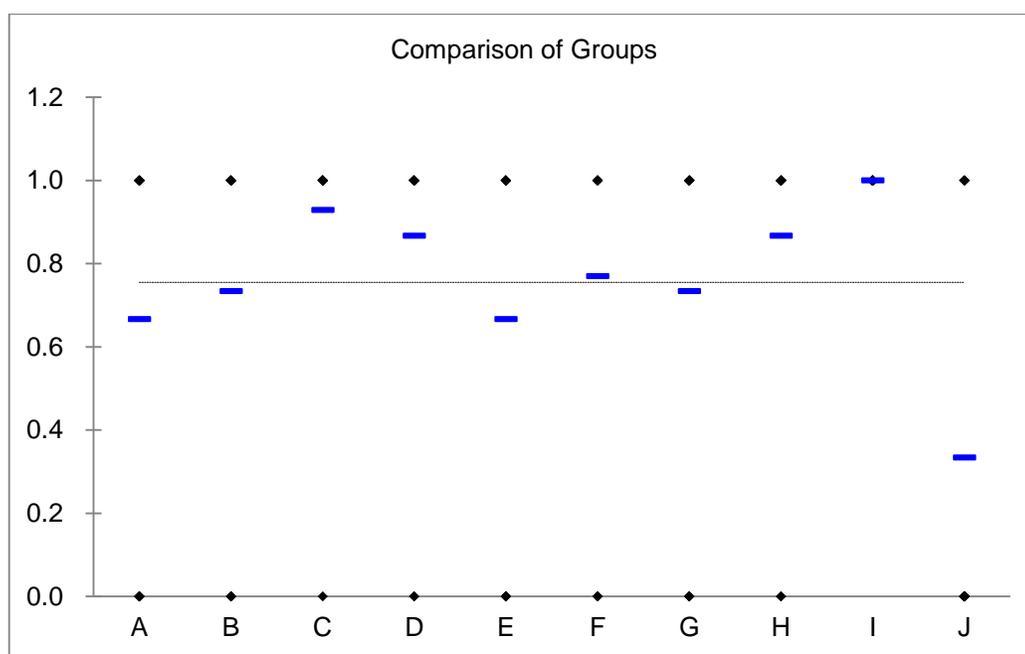
Peritonitis.

Tabla 4. Tabla de ANOVA para peritonitis.

ANOVA table					
Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	4.61	9	0.513	3.11	.0020
Error	22.57	137	0.165		
Total	27.18	146			

P < 0.05

Grafica 7. Comparación de medias de grupos de desafío. Con análisis para peritonitis.



Estadísticamente existe diferencia entre el grupo J con los demás grupos de desafío ya que el aislado inoculado en el grupo J produjo menos peritonitis que el resto de los aislados inoculados en los otros grupos. No existe diferencia entre los grupos de la (A-I) ya que tienen valores similares, y se observa en la gráfica que estos están cercanos a la media promedio.

Congestión pulmonar.

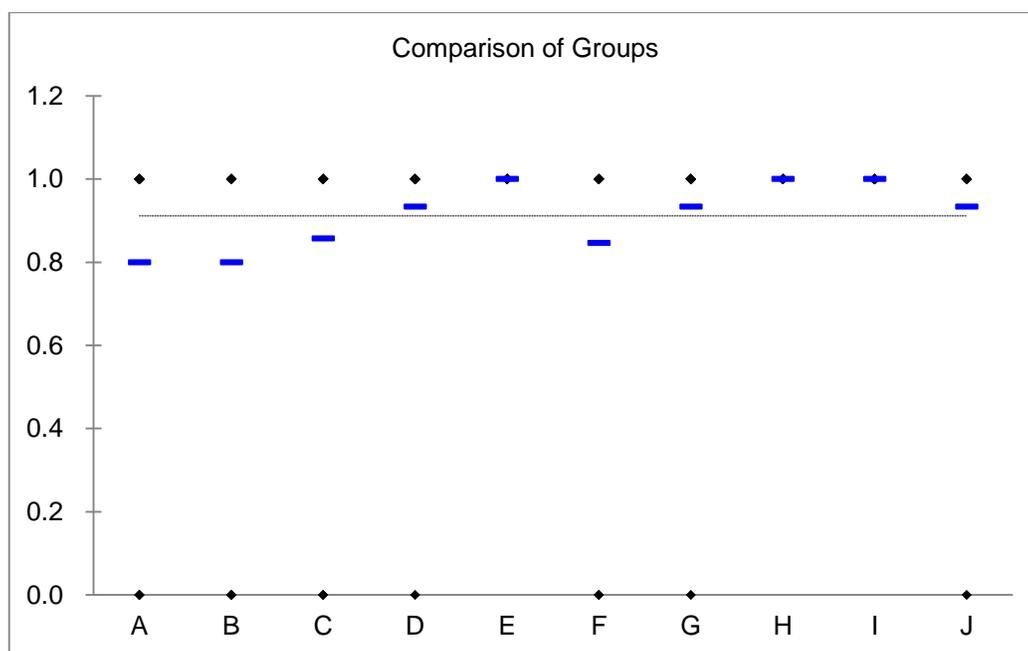
Tabla 5. Tabla de ANOVA para congestión pulmonar.

ANOVA table

Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	0.84	9	0.094	1.17	.3210
Error	11.01	137	0.080		
Total	11.85	146			

P>0.05

Grafica 8. Comparación de medias de grupos de desafío. Con un análisis para congestión pulmonar.



Estadísticamente para el caso de la congestión pulmonar, no existe diferencia entre los diferentes grupos de desafío ya que todos los aislados inoculados produjeron congestión pulmonar con valores similares, y se observa en la gráfica que todos los valores están cercanos a la media promedio.

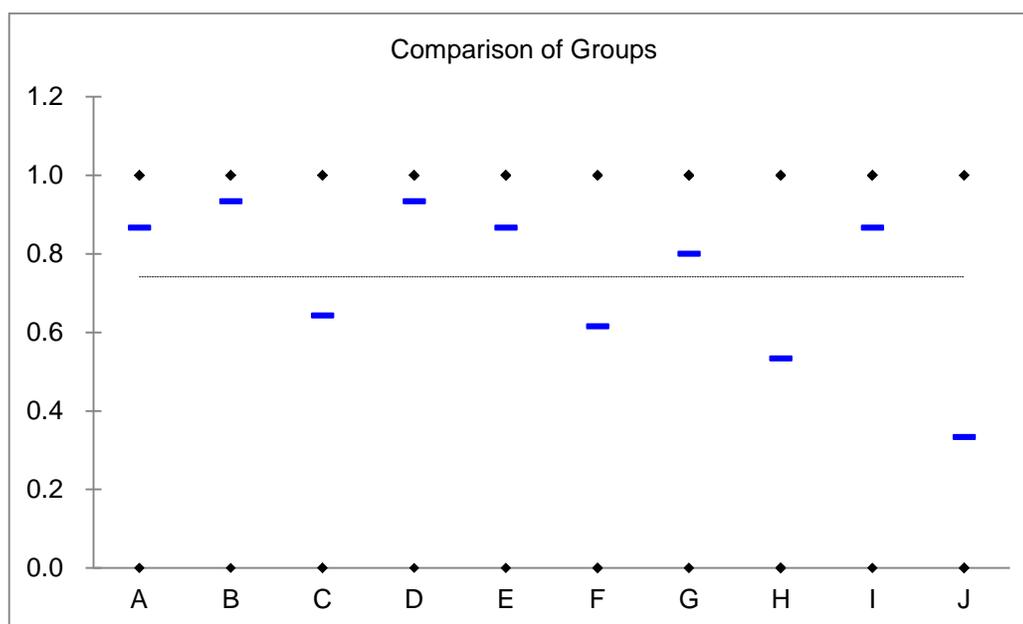
Edema pulmonar.

Tabla 6. Tabla de ANOVA para edema pulmonar.

ANOVA table					
Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	5.35	9	0.595	3.57	.0005
Error	22.82	137	0.167		
Total	28.18	146			

P<0.05

Grafica 9. Comparación de medias de grupos de desafío. Con análisis para edema pulmonar.



El aislado inoculado en el grupo J produjo menos edema pulmonar que el resto de los aislados inoculados en los demás grupos de desafío. Por lo tanto, estadísticamente el grupo J es diferente que el resto de los grupos en la presentación de esta lesión. Estadísticamente no existe diferencia entre los grupos de desafío de la (A–I) ya que tienen valores similares, y se observa en la gráfica que estos están cercanos a la media promedio.

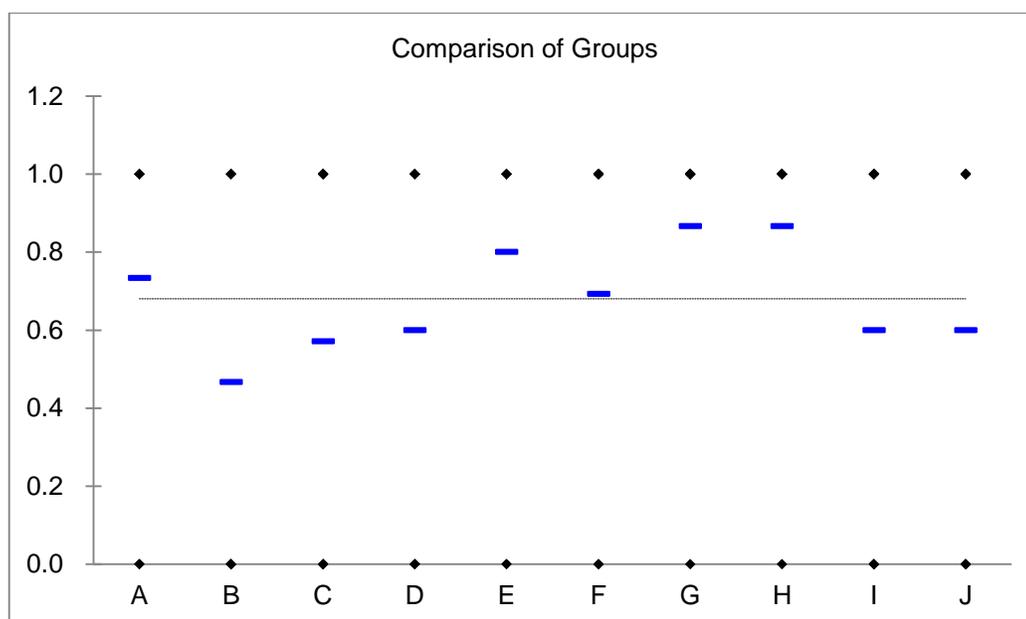
Neumonía fibrinopurulenta.

Tabla 7. Tabla de ANOVA para neumonía fibrinopurulenta.

ANOVA table					
Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	2.44	9	0.271	1.26	.2651
Error	29.53	137	0.216		
Total	31.97	146			

P>0.05

Grafica 10. Comparación de medias de grupos de desafío. Con análisis para neumonía fibrinopurulenta.



Estadísticamente no existe diferencia entre los diferentes grupos de desafío ya que todos los aislados inoculados produjeron neumonía fibrinopurulenta con valores similares, y se observa en la gráfica que todos están cercanos a la media promedio.

Aislamiento bacteriológico a partir de pulmón de las aves desafiadas.

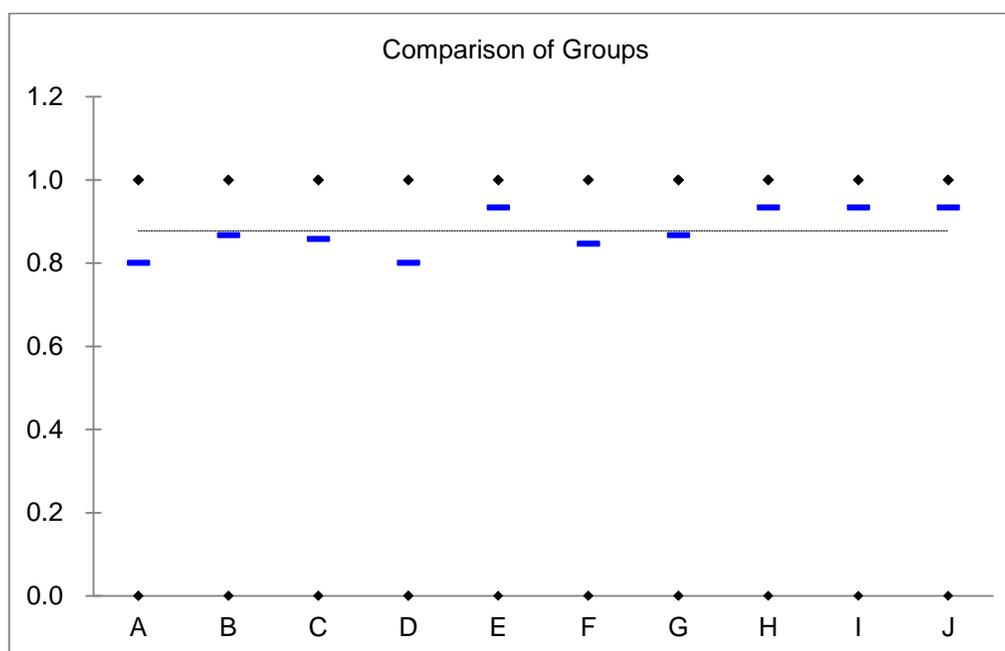
Tabla 8. Tabla de ANOVA para aislamiento bacteriológico de pulmón.

ANOVA table

Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	0.39	9	0.043	0.38	.9408
Error	15.41	137	0.112		
Total	15.80	146			

P>0.05

Gráfica 11. Comparación de medias de grupos de desafío. Con análisis para aislamiento bacteriológico a partir de pulmón.



Estadísticamente no existe diferencia entre los grupos de desafío, ya que todos los aislados inoculados en los diferentes grupos, se recuperaron a partir de pulmón con valores similares y se observa en la gráfica que estos están cercanos a la media promedio.

XI. DISCUSIÓN:

En este trabajo no hubo diferencias respecto a la patogenicidad de los aislados de *E. coli* RC+ y RC- utilizados como inóculos de desafío, ya que ambos produjeron aerosaculitis, peritonitis, neumonía fibrinopurulenta, edema y congestión pulmonar. Estos resultados obtenidos difieren con los obtenidos por Berkhoff y Vinal, en 1986, en donde ellos encontraron una relación directa de algunos aislados de *E. coli* para absorber el colorante rojo congo y su capacidad para producir infecciones septicémicas en pollos. Estos autores realizaron pruebas de patogenicidad en pollos, inoculando aislados de *E. coli* RC+ y RC- en broilers de 4 semanas de edad, vía saco aéreo caudal y encontraron que los aislados RC+ fueron letales para los pollos produciendo aerosaculitis, pericarditis y perihepatitis fibrinosa. Por otra parte los aislados RC- no produjeron lesiones. Demostrando con ello que el fenotipo RC+ está relacionado con la patogenicidad de los aislados de *E. coli*.

En nuestro experimento no fueron observadas lesiones como pericarditis, o perihepatitis fibrinosa, pero sí se observó aerosaculitis, peritonitis, neumonía fibrinopurulenta, edema y congestión pulmonar en todos los grupos desafiados, por ello se consideran patogénicos todos los aislados inoculados tanto RC+ como RC-, de acuerdo a lo referido por Berkhoff y Vinal, en 1986.

Berkhoff y Vinal, en 1986, concluyen que el medio rojo congo puede ser utilizado para distinguir entre *E. coli* aviares patogénicas de las no-patogénicas, y que constituye un marcador fenotípico de virulencia estable, reproducible y fácil de distinguir. Los resultados de nuestro trabajo indican que el fenotipo rojo congo no está relacionado con la patogenicidad de aislados de *E. coli*, ya que ambos aislados con fenotipo RC+ y RC- produjeron lesiones con valores similares.

En el trabajo realizado por Gjessing y Berkhoff, en 1989, demostraron la asociación entre el fenotipo y la patogenicidad de aislados de *E. coli* RC+, exponiendo a un aerosol pollos de 1 día de edad para reproducir la aerosaculitis y la colisepticemia. Para la exposición al aerosol utilizaron aislados de *E. coli* RC+ y RC- como inóculos. De los grupos de aves expuestos al aerosol con aislados de *E. coli* RC+, estas aves presentaron signos (disnea, pluma erizada, letargia), hubo mortalidad y a la necropsia se observaron lesiones como aerosaculitis, pericarditis y perihepatitis fibrinosa. En contraste las aves expuestas con aislados de *E. coli* RC-, ningún ave presentó signos, no hubo mortalidad ni lesiones a la necropsia. Estos autores muestrearon saco aéreo y pulmón post-inoculación de las aves para aislamiento bacteriológico de *E. coli*, y solo se recuperó *E. coli* de las aves expuestas a los

aislados RC+. Confirmando así que el fenotipo RC+ está relacionado con la patogenicidad de los aislados de *E. coli* aviares.

En el presente estudio se determinó que el fenotipo RC+ no es un marcador de virulencia, ya que los aislados de *E. coli* RC+ y RC- inoculados por vía endotraqueal, ambos produjeron aerosaculitis, peritonitis, neumonía fibrinopurulenta, edema y congestión pulmonar. Adicionalmente se obtuvo re-aislamiento de *E. coli* en cultivo puro a partir de hígado y pulmón de todos los grupos de desafío. Estos resultados son similares a los resultados obtenidos por Panigrahy y Yushen, en 1990, ellos desafiaron pollos broilers de 1 semana de edad con 21 aislados de *E. coli* aviares, inoculados por vía saco aéreo torácico posterior izquierdo. Ellos observaron signos, mortalidad y lesiones (aerosaculitis, pericarditis y perihepatitis), tomaron muestras para aislamiento bacteriológico, a partir de sacos aéreos, sangre cardiaca e hígado de los pollos inoculados. De los 21 aislados probados, 15 fueron patogénicos, de los cuales 8 fueron fenotipo RC+ y 7 fueron fenotipo RC-. 6 aislados fueron no-patogénicos, de los cuales 5 fueron fenotipo RC+ y 1 fue fenotipo RC-. Concluyendo que no existe relación entre el fenotipo RC+ y la patogenicidad de aislados de *E. coli* aviares.

Por lo anterior reiteramos que los resultados de nuestro trabajo coinciden con los obtenidos por Panigrahy y Yushen, en 1990, ya que en ambos experimentos no se encontró relación entre el fenotipo RC+ y la patogenicidad de aislados de *E. coli* aviares.

XII. CONCLUSIONES

Todos los aislados de *E. coli* probados tanto RC+ y RC- fueron capaces de producir lesiones. Por lo que se consideran patogénicos.

El aislado de *E. coli* RC- inoculado en el grupo J fue el que mostró menor carácter patogénico.

En este trabajo no se encontró relación entre el fenotipo RC+ y el carácter patogénico de los aislados de *E. coli*.

Se encontró que la prueba de desafío es de gran valor para evidenciar la naturaleza patogénica de los aislados de *E. coli*.

XIII. SUGERENCIAS

Sé sugiere continuar con estudios de patogenicidad, para establecer una metodología de diagnóstico que permita identificar aislados APEC, de manera sencilla.

Sé sugiere realizar estudios moleculares para identificar genes de virulencia de aislados de *E. coli* aviaries, que podrían utilizarse como marcadores de virulencia para identificar APEC.

Sé sugiere estudiar la patogenia de la colibacilosis en aves ligeras en las diferentes etapas de producción.

XIV. LITERATURA REVISADA

1. Amara A, Zakia Z, Bouzoubaa K. (1995): Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*, 43:325-330.
2. Barnes H, Vaillancourt J, Gross W. (2003): Colibacillosis, en: *Diseases of Poultry*. 18, 11 ed. Editado por Saif Y.M., 691-737, Blackwell Publishing Professional, Iowa State Press, USA.
3. Berkhoff H, Vinal A. (1986): Congo Red Medium to Distinguish between Invasive and Non-Invasive *Escherichia coli* Pathogenic for Poultry. *Avian Diseases*, 30(1):117-121.
4. Biarnés M. (2006): Micoplasmosis, Coriza y Colibacillosis, en: *Higiene y patología aviar*, 2ª edición, capítulo 5, Real Escuela de Avicultura.
5. Blanco J, Alonso MP, Blanco M, González EA. (1991): Mecanismo de patogénesis de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, 6:163-176.
6. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Cansen W, García V, Vázquez M, Blanco J. (1998): Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Veterinary Microbiology*, 61:229-235.
7. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Blanco J. (1996): *Escherichia coli* septicémicos aviares: serotipos, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y desarrollo de vacunas. *Medicina Veterinaria*, 13:525-535.
8. Bolin CA. (1986): Effects of exogenous iron on *E. coli* septicemia in Turkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 47:1813-1816.
9. Brée A, Dho M, Lafont JP. (1989): Comparative infectivity for axenic and specific pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. *Avian Diseases*, 33:134-139.
10. Buxadé C. (2000): *La gallina ponedora*. 2ª Edición., Mundi-Prensa, Madrid.
11. Cavero D, Schmutz H, Philipp H, Preisinger R. (2009): Breeding to reduce susceptibility to *Escherichia coli* in layers. *Poultry Science*, 88:2063-2068.
12. Collinson SK, Clouthier SC, Doran JL, Banser PA, Kay WW. (1996): Salmonella enteritidis agfBAC operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J. Bacteriol.*, 178:662-667.

13. Corbett W, Berkhoff H, Vinal AC. (1987): Epidemiological study of the relationship between Congo red binding *Escherichia coli* and avian colisepticemia. *Can. J. Vet. Res.*, 51:312-315.
14. Da Silveira W, Ferreira A, Brocchi M, de Hollanda LM, Pestana de Castro A, Tatsumi Yamada A, Lancellotti M. (2002): Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Veterinary Microbiology*, 85:47-53.
15. Daskaleros P, Payne SM. (1985): Cloning the gene for Congo red binding in *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, 48:165-168.
16. Daskaleros P, Payne SM. (1986): Characterization of *Shigella flexneri* sequences encoding Congo red binding (CRB): conservation of multiple CRB sequences and role of IS1 in loss of the CVB+ phenotype. *Infect. Immun.*, 54:435-443.
17. Delicato ER, Guimaraes de Brito B, Gaziri LC, Vidotto MC. (2003): Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*, 94:97-103.
18. Dho-Moulin D, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C. (2007): Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10):3366-3376.
19. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. (1999): Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 30(2-3):299-316.
20. Dho-Moulin M. (1993): Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 137:353-357.
21. Dozois CM, Chanteloup N, Dho-Moulin M, Bree A, Desautels C, Fairbrother JM. (1994): Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type-1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 38:231-239.
22. Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtis R. (2000): Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. *Infection and Immunity*, 68(7): 4145–4154.
23. Dozois CM, Pourbakhsh SA, Fairbrother JM. (1995): Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in Pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Veterinary Microbiology*, 45:297-309.

24. Ellis MG, Arp LH, Lamont SJ. (1988): Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. *American Journal of Veterinary Diseases*, 49:2034-2037.
25. Ewers C, Janben T, Kiebling S, Philipp HC, Wieler LH. (2004): Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, 104:91-101.
26. Ewers C, Janben T, Kiebling S, Philipp HC, Wieler LH. (2005): Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 49:269-273.
27. Ewers C, Janben T, Wieler LH. (2003): Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 116:381-395.
28. Ferreira AJP, Silva EN. (1991): Pathogenicity factors of chicken *Escherichia coli* strains: comparative study among pathogenic and apathogenic strains, en: *Proceedings of the 128th Annual Meeting of American Veterinary Medical Association*. Editado por American Association of Avian Pathologist (AVMA AAAP)., 135-136, Seattle, WA.
29. Ginns CA, Browning GF, Benham ML, Anderson GA, Whithear KG. (1996): Antimicrobial resistance and epidemiology of *Escherichia coli* in broiler breeder chickens. *Avian Pathology*, 25:591-605.
30. Gjessing k, Berkhoff H. (1989): Experimental Reproduction of Airsacculitis and Septicemia by Aerosol Exposure of 1-Day-Old Chicks Using Congo Red-Positive *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 33(3):473-478.
31. Gomis SM, Riddell C, Potter AA, Allan BJ. (2001): Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 65:1-6.
32. Gophna U, Barlev M, Seijffers R, Oelschlager TA, Hacker J, Ron EZ. (2001): Curli Fibers Mediate Internalization of *Escherichia coli* by Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 69(4):2659–2665.
33. Gross WB, Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW. (1991): Colibacillosis, en: *Diseases of poultry*. 9^a ed. 138-144, Ames: Iowa States University Press.
34. Gyles GL. (1993): *Escherichia coli* en: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2^{da} ed. Editado por Gyles CL, Thoen CO., 164- 187, Ames, Iowa State University Press.

35. Hammar M, Bian Z, Normark S. (1996): Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci., 93:6562–6566.
36. Jeffrey JS, Nolan LK, Tonooka KH, Wolfe S, Giddings CW, Horne SM, Foley SL, Lynne AM, Ebert JO, Elijah LM, Bjorklund G, Pfaff-McDonough SJ, Singer RS, Dorkott C. (2002): Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. Avian Diseases, 46:48-52.
37. Johnson JR, Clermont O, Kuskowski M, Menard M, Picard B, Denamur E. (2006b): Experimental Mouse Lethality of *Escherichia coli* Isolates, in Relation to Accessory Traits, Phylogenetic Group, and Ecological Source. Journal of Infectious Diseases, 194:1141-1150.
38. Johnson TJ, Siek KE, Johnson S, Nolan LK. (2006a): DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. Journal of Bacteriology, 188(2):745-758.
39. Johnson TJ, Skyberg J, Nolan LK. (2004): Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. Avian Diseases, 48(2):351-60.
40. Jordan FT, Williams NJ, Wattret A, Jones T. (2005): Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock. The Veterinary Record, 157(19):573-577.
41. Kariuki S, Gilks C, Kimari J, Obanda A, Muyodi J, Waiyaki P, Hart A. (1999): Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact. Applied and Environmental Microbiology, 65(2):472-476.
42. Kariyawasam S, Wilkie BN, Hunter DB, Gyles CL. (2002): Systemic and mucosal antibody responses to selected cell surface antigens of avian pathogenic *Escherichia coli* in experimentally infected chickens. Avian Diseases, 46:668-678.
43. La Ragione RM, Woodward MJ. (2002): Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. Research in Veterinary Science, 73:27-35.
44. La Regione RM, Cooley WA, Woodward MJ. (2000): The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and traqueal and gut explants. J. Med. Microbiol., 49:327-338.

45. Landman WJ, Cornelissen RA. (2006a): *Escherichia coli* salpingitis and peritonitis in layer chickens: an overview. Tijdschr Diergeneeskd, 15;131(22):814-822.
46. Landman WJ, Cornelissen RA. (2006b): Virulence factors of *Escherichia coli*, with emphasis on avian pathogenic isolates. Tijdschr Diergeneeskd, 15;131(22):822-830.
47. Loferer H, Hammar H, Normark S. (1997): Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. Mol. Microbiol., 26:11–23.
48. Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Trayer SG. (1998): The occurrence of ambient temperature-regulated adhesions, curli and the temperature-sensitive hemagglutinin *tsh* among avian *Escherichia coli*. Avian diseases, 42(1):106-18.
49. McPeake SJW, Smyth JA, Ball HJ. (2005): Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. Veterinary Microbiology, 110:245-253.
50. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, Lehoux B, Fairbrother JM. (2003b): Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. Infection and Immunity, 71(1):494-503.
51. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, Peter K, Brown, Pascal A, Brée A, Desautels C, Fairbrother JM. (2003a): Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. Infection and Immunity, 71(1):536–540.
52. Monroy MA, Knöbl T, Bottino JA, Astolfi CS, Ferreira AJ. (2005): Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 28:1-15.
53. Morris JA, Sojka WJ. (1985): *Escherichia coli* as a pathogen in animals, en: The virulence of *E. coli*. Editado por Sussman M., 47-77, Academic Press, Londres.
54. Nakamura K, Cook JKA, Frazier JA, Narita M. (1992): *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infectious bronchitis virus and/or *Escherichia coli*. Avian Diseases, 36:881-890.

55. Nakamura K, Yuasa N, Abe H, Narita M. (1990): Effect of infectious bursal disease virus on infections produced by *Escherichia coli* of high and low virulence in chickens. *Avian Pathology*, 19(4):713-721.
56. Nataro JP, Kaper JB. (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11:142-201.
57. Nolan LK, Wooley RE, Brown J, Spears KR, Dickerson HW, Dekich M. (1992b): Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 36:395-397.
58. Nolan LK, Wooley RE, Cooper RK. (1992a): Transposon mutagenesis used to study the role of complement resistance in the virulence of an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Diseases*, 36:398-402.
59. Olsen A, Arnqvist A, Hammar M, Normark S. (1993): Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect. Agents Dis.*, 2:272–274.
60. Olsen A, Jonsson A, Normark S. (1989): Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, 338:652–655.
61. Olsen A, Wick MJ, Mörgelin M, Björck L. (1998): Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect. Immun.*, 66:944–994.
62. Panigrahy B, Yushen L. (1990): Differentiation of Pathogenic and Nonpathogenic *Escherichia coli* Isolated from Poultry. *Avian Diseases*, 34(4):941-943.
63. Pfaff-McDonough SJ, Horne SM, Giddings CW, Ebert JO, Doertkott C, Smith MH, Nolan LK. (2000): Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Diseases*, 44(1):23-33.
64. Pourbakhsh SA, Boulianne M, Martineau-Doize B, Fairbrother JM. (1997b): Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet. Microbiol.*, 58:195-213.
65. Pourbakhsh SA, Dho-Moulin M, Bree A, Desautels C, Martineau-Doize B, Fairbrother JM. (1997a): Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 22:331-341.
66. Provence DL, Curtiss III R. (1992): Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. *Infect. Immun.*, 60:4460-4467.

67. Provence DL, Curtiss R. (1994): Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*, 62(4):1369-1380.
68. Prpic J, Robbins-Browne R, Brent Davey R. (1983): Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia pestis* by using Congo red agar. *J. Clin. Microbiol.*, 18:486-490.
69. Qadri F, Hossan I, Ciznar K, Haider A, Ljungh T, Wadstrom, Sack D. (1988): Congo red binding and salt aggregation as indicators of virulence in *Shigella* species. *J. Clin. Microbiol.*, 26:1343-1348.
70. Radu S, Ling OW, Rusul G, Abdul Karim MI, Nishibuchi M. (2001): Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *Journal of Microbiological Methods*, 46:131-139.
71. Rakin A, Urbitsch P, Heesemann J. (1995): Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. *Journal of Bacteriology*, 177:2292-2298.
72. Rodriguez A. (2002): Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(5):464-475.
73. Römling U, Bian Z, Hammar H, Sierralta WD, Normark S. (1998): Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.*, 180:722-731.
74. Sahm DF, Washington JA. (1985): Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution Methods, en: *Manual of clinical microbiology*. 4ª ed. Editado por Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ., 1105-1116, American society for Microbiology, Washington.
75. Schroeder CM, Meng J, Zhao S, DebRoy C, Torcolini J, Zhao C, McDermott PF, Wagner DD, Walker RD, White DG. (2004): Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 8(12):1409-14.
76. Siek K, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. (2005a): Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research*, 36:241-256.
77. Siek K, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. (2005b): Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, 151:2097-2110.
78. Skyberg J, Shelley M, Horne, Giddings CW, Wooley RE, Gibbs PS, Nolan LK. (2003): Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 47:1441-1447.

79. Surgalla M, Beasley E. (1969): Congo red agar medium for detecting pigmentation in *Pasteurella pestis*. *Appl. Microbiol.*, 18:834-837.
80. Todar K. (2008): Pathogenic *E. coli*, en <http://www.textbookofbacteriology.net/> University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.
81. Vandekerchove D, De Herdt P, Laevens H, Pasmans F. (2004b): Risk factors associated with colibacillosis outbreaks in caged layer flocks. *Avian Pathology*, 33(3):337-342.
82. Vandekerchove D, De Herdt P, Laevens H, Pasmans F. (2004c): Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. *Avian Pathology*, 33(2):117-125.
83. Vandekerchove D, Herdt PD, Laevens H, Butaye P, Meulemans G, Pasmans F. (2004a): Significance of interactions between *Escherichia coli* and respiratory pathogens in layer hen flocks suffering from colibacillosis-associated mortality. *Avian Pathology*, 33(3):298-302.
84. Vandekerchove D, Vandemaele F, Adriaensen C, Zaleska M, Hernalsteens JP, De Baets L, Butaye P, Van Immerseel F, Wattiau P, Laevens H, Mast J, Goddeeris B, Pasmans F. (2005): Virulence associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Veterinary Microbiology*, 108:75-87.
85. Vera L. (1988): Estudio de la virulencia de cuatro aislamientos de *Salmonella gallinarum* y su Resistencia a la furazolidona. Tesis de licenciatura, FMVZ, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.
86. Vidotto M, Navarro HR, Gaziri L. (1997): Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 59:79-85.
87. Wooley RE, Gibbs PS, Brown TP, Glisson JR, Steffens WL, Maurer JJ. (1998): Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. *Avian Diseases*, 42:194-198.
88. Wooley RE, Spears E, Brown J, Nolan LK, Fletcher OJ. (1992): Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 36:679-684.
89. Zanella A, Alborali G, Bardotti M, Candotti P, Guadagnini P, Anna Martino P, Stonfer M. (2000): Severe *Escherichia coli* O111 septicaemia and polyserositis in hens at the start of lay. *Avian Pathology*, 29:311-317.