

37
2e/



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

CARACTERIZACION DE CEPAS DE *Escherichia coli*
ROJO CONGO NEGATIVAS AISLADAS DE AVES
CON COLIBACILOSIS.

T E S I S

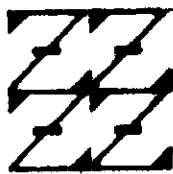
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

GUILLERMO MARQUEZ SALGADO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO VIVIAMOS EN
DE NUESTRA REFLEXION

ASESORES: O.B.P. GRACIELA CASIRO ESCARPULLI
O.F.B. ARACELI GARCIA DEL VALLE.

MEXICO, D. F.

258567

FEBRERO, 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN :

EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA MÉDICA, DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. BAJO LA ASESORÍA DE:

**Q. B. P. GRACIELA CASTRO ESCARPULLI
Q. F. B. ARACELI GARCÍA DEL VALLE.**

DENTRO DEL PROYECTO:

"LA COLIBACILOSIS EN EL POLLO DE ENGORDA, ELABORACIÓN DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA PREVENCIÓN". CLAVE D.E.P.I. 941735.

DIRECTOR Q.B.P. JOSÉ NAZARIO FELIX SOTO.

FORMA PARTE DEL PROGRAMA:

"ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS, ELABORACIÓN DE PRODUCTOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y PREVENCIÓN". CLAVE D.E.P.I. 931311.

**GRACIAS POR TODA SU AYUDA, INFINITA
PACIENCIA Y TIEMPO QUE ME BRINDARON. MIL
GRACIAS... NO, MEJOR UN MILLÓN DE GRACIAS.**

QBP GRACIELA CASTRO ESCARPULLI

QFB ARACELI GARCÍA DEL VALLE

QBP MA. LUISA DELGADO BRISEÑO

QFB MA. DEL PILAR CEDILLO MARTÍNEZ

QBP JOSÉ NAZARIO FELIX SOTO

A MIS PAPÁS

VIGILARON MIS SUEÑOS
INICIARON MIS PASOS
RESOLVIERON MIS DUDAS
GUIARON MIS SENTIMIENTOS
INFUNDIERON VALOR
NADIE MEJOR QUE ELLOS
INCLUSO
AHUYENTARON MIS TEMORES

Y

GRACIAS POR TODO
USTEDES
ILUMINAN MI VIDA
LLENAN MI CORAZÓN
ESCUCHAN MIS ILUSIONES
RESPONDEN MI VOZ
MANTIENEN MI FE
OTORGAN SU AMOR

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. COLIBACILOSIS AVIAR.	2
1.2. ETIOLOGÍA.	4
1.3. PATOGENIA Y EPIZOOTIOLOGÍA.	8
1.4. DIAGNÓSTICO.	10
1.5. TRATAMIENTO.	12
1.6. PREVENCIÓN Y CONTROL.	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	14
3. OBJETIVOS.	15
4. HIPÓTESIS.	16
5. MATERIAL Y MÉTODO.	17
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	17
5.2. METODOLOGÍA.	17
6. RESULTADOS.	31
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	38
8. CONCLUSIONES.	40
9. APÉNDICE.	41
10. REFERENCIAS.	46

ÍNDICE DE TABLAS

No	TABLA	PÁGINA
1.	ANTIMICROBIANOS PROBADOS	22
2.	BIOTIPIFICACIÓN DE <i>E. coli</i> DE ACUERDO AL CRITERIO DE CRICHTON	24
3.	RESISTOTIPO: QUÍMICOS Y COLORANTES PROBADOS	26
4.	RESISTENCIA ANTIMICROBIANA IN VITRO DE CEPAS DE <i>E. coli</i> AISLADA DE POLLOS	32
5.	FERMENTACIÓN DE AZÚCARES Y ACTIVIDAD DE ORNITINA DESCARBOXILASA DE <i>E. coli</i> AISLADA DE POLLOS	34
6.	BIOTIPOS DE <i>E. coli</i> AISLADA DE POLLOS SEGÚN EL ESQUEMA DE CRICHTON	35
7.	RESISTENCIA A METALES PESADOS Y COLORANTES DE <i>E. coli</i> AISLADA DE POLLOS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

No	FIGURA	PÁGINA
1.	ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	19
2.	TIPIFICACIÓN POR ANTIBIOGRAMA (SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA)	21
3.	BIOTIPIFICACIÓN	23
4.	RESISTOTIPIFICACIÓN: MÉTODO DE INCLUSIÓN EN AGAR	25
5.	PRUEBA DE SERENY	28

ÍNDICE DE GRÁFICAS

No	GRÁFICA	PÁGINA
1.	RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE 85 CEPAS DE <i>E. coli</i> AISLADAS DE POLLOS	33
2.	RESISTENCIA A METALES PESADOS DE 85 CEPAS DE <i>E. coli</i> AISLADA DE POLLOS	37

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

No	FOTO	PÁGINA
1.	PRUEBA DE CAPTACIÓN DEL ROJO CONGO	18
2.	PRUEBA DE SERENY	29

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* ROJO CONGO NEGATIVAS AISLADAS DE AVES CON COLIBACILOSIS

1. INTRODUCCIÓN.

La colibacilosis aviar es una enfermedad infecciosa de las aves en la cual *Escherichia coli* es el patógeno primario o secundario.

En pollos *E. coli* infecta el torrente sanguíneo, vía tracto respiratorio, causando septicemia, mientras que en los mamíferos, tales como los humanos, ganado y cerdos, la *E. coli* infecta el tracto digestivo e induce diarrea. Las infecciones causadas por *E. coli* son la causa más importante de morbilidad y mortalidad en aves domésticas y, por lo tanto, es la responsable de grandes pérdidas económicas en la industria aviar.^{12, 20, 36}

Las dos razones fundamentales por las cuales la colibacilosis aviar no es similar a la que ocurre en mamíferos son:

1. La baja susceptibilidad de las aves a la endotoxina de *E. coli*; por ejemplo, la dosis de 1 mg/Kg de peso para pollos de 5 semanas de edad provoca sólo fiebre ligera, mientras que la dosis de 0.01 mg/Kg es letal para becerros de la misma edad.
2. La menor incidencia de cepas productoras de enterotoxina; por lo que el síndrome diarreico, un problema grave en humanos, cerdos y bovinos, es más bien raro en aves.³¹

Aunque se han implicado una variedad de factores de virulencia en la promoción de la colonización de la mucosa e invasividad, incluyendo: expresión de fimbrias tipo 1 y adherencia, la producción de colicina V, la síntesis de aerobactina, la resistencia al suero y la captación al rojo congo; el mecanismo general por el cual las cepas patógenas de *E. coli* causan la colisepticemia y otras enfermedades extraintestinales en especies aviares aún no ha sido explicado.¹⁴⁻¹⁵

Para evaluar la capacidad enteroinvasiva de *E. coli*, se han desarrollado técnicas in vitro utilizando células Hela y Hep-2, así como técnicas de biología molecular como hibridación del DNA empleando secuencias de los genes relacionados con la invasión y la reacción en cadena de la polimerasa. No obstante, la prueba de referencia para la determinación de la enteroinvasividad de

cepas de *E. coli* y *Shigella* spp de origen humano continua siendo la prueba desarrollada por Sereny en 1955.^{24,31}

Lo laborioso de estas pruebas (Sereny, cultivo celular), ha conducido al estudio de caracteres fenotípicos propios de la cepas que permitan seleccionarlas con facilidad. Berkhoff y Vinal en un estudio con el medio rojo congo para determinar la invasividad de *E. coli*, encontraron que las cepas aviares virulentas podían ser identificadas por su capacidad para unirse al colorante rojo congo presente en el medio.⁵

En la actualidad existen diversos métodos de tipificación epizootiológica de *E. coli*; estos incluyen, además de la serotipificación, la antibiotipificación, la biotipificación y la resistotipificación. Cada uno de estos métodos presenta diferentes ventajas y desventajas.⁶

El propósito del presente estudio es determinar los biotipos, resistotipos y los patrones de resistencia más comunes de cepas de *E. coli* rojo congo negativa de origen aviar; además de corroborar si existe alguna relación entre las cepas rojo congo negativas y su virulencia mediante la prueba de Sereny.

1.1. COLIBACILOSIS AVIAR.

La colibacilosis en aves de corral se presenta en cuatro formas:

1. La infección del saco vitelino, que resulta de la contaminación del huevo. El cascarón se contamina al momento de postura a su paso por la cloaca de las gallinas.
2. La colibacilosis enterotóxica, es poco frecuente en las aves y es provocada por cepas capaces de producir una enterotóxina que aumenta la pérdida de líquidos en el lumen intestinal, sin que necesariamente ocurra invasión al organismo, actuando la mayoría de la veces sólo a nivel de epitelio intestinal.
3. La aerosaculitis es una enfermedad respiratoria de las aves de corral. En general, la aerosaculitis por *E. coli* se cree que es una infección secundaria. Sin embargo, se han documentado brotes de aerosaculitis causados por *E. coli* actuando como patógeno primario.
4. La colibacilosis sistémica que se presenta por la entrada al organismo de ciertas cepas invasivas.³¹

La aerosaculitis y la septicemia por *E. coli* puede ocurrir en las aves a cualquier edad durante su período de crecimiento, pero es más común entre la 5a y 7a semana de edad.^{31, 33}

La colisepticemia frecuentemente comienza como una infección del aparato respiratorio superior, después de la exposición a aerosoles, seguida por infiltración al sistema vascular sanguíneo y una fase invasiva caracterizada por lesiones en los órganos internos.^{8, 9, 14} La necropsia de aves muertas revela las siguientes lesiones :

- a) Peritonitis; denotada por la presencia de un depósito amarillo viscoso en la superficie de los intestinos, órganos abdominales y sacos aéreos.
- b) Pericarditis; manifestada por un crecimiento amarillo fibrinoso del tejido que rodea al corazón.
- c) Perihepatitis; hay dilatación del hígado que a menudo asume un color verde y esta cubierto de un exudado fibrinoso.
- d) Congestión de los vasos sanguíneos de los sistemas respiratorio y digestivo.
- e) La presencia de un fluido espumoso en los pulmones, que adquiere un color rojo oscuro a violáceo.^{15, 16}

Las investigaciones epizootiológicas detalladas referentes al origen y curso de brotes de colisepticemia, generalmente revelan un complejo de factores que comprenden una interrelación entre causas ambientales y relacionadas con otras enfermedades.

Los factores ambientales principales que provocan la colisepticemia son:

- A) Tensión térmica, que comprende enfriamiento y fluctuación marcada en la temperatura diurna.
- B) Humedad ambiente sumamente baja (lechos muy secos).
- C) Stress o estados de tensión. En pollos de engorde infectados vía oral, la tensión o stress resultó en bacteremia y mortalidad elevada.
- D) Altos niveles de polvo atmosférico.
- E) Contaminación del suministro de agua de beber y de los bebederos con *Escherichia coli* patógena.
- F) La presencia de amoníaco en niveles superiores a 50 ppm.
- G) Los niveles de exposición y duración a los agentes infecciosos.^{20, 31}

Las enfermedades que predisponen hacia la aparición de colisepticemia comprenden:

- A) Micoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*).
- B) Virus de la enfermedad de Newcastle.

- C) Virus de la enfermedad de la bolsa de fabricio.
- D) Virus de la bronquitis infecciosa (IBV). La bronquitis infecciosa es una de las enfermedades infecciosas respiratorias más severas y contagiosas de los pollos y es causada por el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), el cual es del género Coronavirus.
- E) Hepatitis por cuerpos de inclusión (Adenovirus aviar).
- F) Reacción adversa a vacunas de virus activo modificado. ^{15, 18, 20, 31}

1.2. ETIOLOGÍA.

Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichiae, género *Escherichia*, especie *Escherichia coli*. Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, capsulado, no esporulado, móvil (posee flagelos peritricos) o no, catalasa positivo, citocromo oxidasa negativo, reduce los nitratos a nitritos, licua la gelatina, indol positivo, rojo de metilo positivo, Voges Proskauer negativo, citrato negativo y ureasa negativo; acidifica y produce gas a partir de glucosa, maltosa, manitol, lactosa, xilosa, ramnosa y arabinosa. ¹⁸

E. coli se desarrolla mejor a 35°C; después de 24 horas de incubación, en agar MacConkey sus colonias son lisas, mucoides, convexas, circulares, de 2-3 mm de diámetro, brillantes y de color rosa a rojo debido a la fermentación de la lactosa. ^{16, 17}

La identificación de las diferentes cepas de *E. coli* se hace en base a la serotipificación de tres antígenos (sistema de Kauffman, 1944); el antígeno "O" que se encuentra en la membrana celular, el "K" o capsular y el "H" o flagelar. Hasta ahora se conocen 171 antígenos O, 103 antígenos K y 56 antígenos H. La serotipificación O:H generalmente es la más adecuada para estudios epizootiológicos.

Las cepas patógenas de *E. coli* han sido aisladas de humanos, animales y aves. De acuerdo a su mecanismo de patogenicidad, se han clasificado en cinco grupos:

1. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).
2. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).
3. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).
4. *E. coli* enteropatógena (EPEC).
5. *E. coli* enteroagregativa (EAggEC). ^{4, 19, 24}

1. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

La ETEC es una causa común de deshidratación diarreica en niños de países en desarrollo y de la "diarrea del viajero" en adultos de países industrializados que viajan a países en desarrollo. Agua y alimentos contaminados han sido considerados los vehículos transmisores en la mayoría de los brotes que han afectado tanto a niños como adultos. Se cree que la razón de que las ETEC causen diarrea principalmente en países poco desarrollados es que estas bacterias, al igual que *Vibrio cholerae*, para llegar a desencadenar la deshidratación deben ser ingeridas en dosis elevadas, de 10^8 a 10^9 . Naturalmente, para que estas dosis se alcancen, las condiciones higiénico-sanitarias tienen que ser muy deficientes.

Las ETEC pueden sintetizar enterotoxinas termolábiles (LT-I y LT-II) y enterotoxinas termoestables (STa y STb). Las enterotoxinas termolábiles son proteínas de elevado peso molecular (85000 a 87000 Da), constituidas por una subunidad A y cinco subunidades B, mientras que las termoestables son pequeños polipéptidos de 1900 a 5000 Da. Las enterotoxinas actúan incrementando la concentración de adenosín ó guanósín monofosfato cíclico en los enterocitos, lo que provoca una fuerte salida de agua y electrolitos al lumen intestinal. Pero para que una ETEC pueda causar diarrea, además de sintetizar enterotoxinas debe poseer un factor de colonización que le permita adherirse y colonizar el epitelio del intestino delgado, evitando con ello la acción de lavado mecánico ejercido por el peristaltismo intestinal. La adherencia de las ETEC es debida a la presencia de filamentos proteicos que se proyectan a lo largo de toda la superficie de las bacterias. Dichos filamentos consisten en estructuras fimbriales rígidas o fibrilares flexibles constituidas por unas 1000 subunidades estructurales repetitivas, y unas pocas subunidades funcionales, entre las que se encuentran las responsables de la adhesión. Tanto las enterotoxinas como los factores de colonización de las ETEC se encuentran codificados en genes plasmídicos. Las ETEC de origen humano y animal producen enterotoxinas similares, pero presentan diferentes factores de colonización que son los responsables de la especificidad de huésped existente, es decir, que las ETEC de origen animal no pueden causar infecciones en seres humanos y viceversa. Así, las de origen humano expresan los factores de colonización CFA/I, CFA/II, CFA/III y CFA/IV. Además, las ETEC de origen humano y animal pertenecen a serotipos O:K:H totalmente diferentes. La mayoría de las cepas de ETEC aisladas en Europa pertenecen al serotipo O153:K:H45 y presentan un plásmido de elevado peso molecular (82 a 87 Mda), que es portador de la información para la expresión del factor de colonización CFA/I y la síntesis de la enterotoxina STa. Las cepas de este serotipo se han aislado también frecuentemente en Hispanoamérica, pero son raras en otras regiones geográficas del mundo. También se han aislado con relativa frecuencia ETEC de los serotipos O6:K15:H16 y O27:K:H7.^{4, 19}

2. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).

Las *E. coli* productoras de verotoxinas han recibido diferentes denominaciones en la bibliografía: *E. coli* verotoxigénicas (VTEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) y *E. coli* productoras de toxinas semejantes a shiga (SLTEC).

Las verotoxinas son potentes citotoxinas que destruyen las células de la línea continua Vero (células de riñón de mono verde africano) cultivadas in vitro. Existen dos tipos de verotoxinas, VT1 (ó SLT-I) y VT2 (ó SLT-II) y diversas variantes de VT2, tales como la VT2vha y la VT2vhb. La gran mayoría de las cepas humanas producen VT1 y VT2. Las secuencias nucleotídica y aminoacídica del gen VT1 son prácticamente idénticas a las de la toxina shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. No es de extrañar, por tanto, que la actividad biológica de VT1 sea neutralizada por un antisuero contra la toxina shiga. La VT2 y sus variantes, aunque están estructural, genética y funcionalmente relacionadas con la VT1 sólo presentan una homología de secuencias en sus genes del 55-60% con el gen VT1. Si bien la VT2 y sus variantes también son consideradas "shiga like toxins", sus actividades biológicas no son neutralizadas con un antisuero contra la toxina shiga. Las verotoxinas están constituidas por una subunidad enzimática A (de aproximadamente 33000 Da) y cinco subunidades B (de aproximadamente 7500 Da) que fijan la toxina a receptores celulares compuestos por glicolípidos (receptores Gb3 ó Gb4). Estas toxinas inhiben la síntesis proteica al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 60S. Las verotoxinas son liberadas en el intestino y, tras ser absorbidas, pasan a la sangre causando lesiones en el endotelio vascular. Inducen una coagulación intravascular local y una acumulación de fibrina en el sistema nervioso central, en el tubo digestivo y en los riñones. Todo esto puede conducir a un daño intestinal, renal, cerebral ó multisistémico. Las EHEC pueden provocar en los seres humanos colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico (SUH), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), diarrea no sanguinolenta e incluso infecciones asintomáticas. La presentación clínica más común es la colitis hemorrágica, caracterizada por un cuadro severo de dolor abdominal y diarrea sanguinolenta.

Las EHEC, además de producir verotoxinas, presentan factores de virulencia adicionales que incrementan su poder patógeno. Así, las EHEC se unen al epitelio del intestino grueso a través de unas fimbrias plasmídicas codificadas en el gen CDV419 y posteriormente barren las microvellosidades intestinales por la acción de unas proteínas presentes en su membrana externa que están controladas por el gen cromosómico EAE.

Las EHEC causantes de infecciones en seres humanos pertenecen a un amplísimo abanico de serotipos, habiéndose detectado la producción de verotoxinas en cepas pertenecientes a unos 50 serotipos "O" diferentes. Sin embargo, la *E. coli* O157:H7 es el prototipo de EHEC.^{4, 19}

3. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC).

La EAggEC se ha encontrado asociada con diarreas persistentes (de más de dos semanas de duración) en numerosos países. La EAggEC fue así llamada porque estas cepas se adhieren a las células Hep-2 ó HeLa en un patrón agregativo (alineadas en filas paralelas). La EAggEC produce una toxina semejante a la ST la cual incrementa los niveles intracelulares de GMP cíclico y una toxina LT de aproximadamente 120 KDa la cual se ha reportado que incrementa el calcio intracelular, y un factor de colonización fimbrial denominado AAF/I.^{4, 13, 19}

4. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

El término *E. coli* enteropatógena es comúnmente usado para describir a ciertos serotipos de *E. coli* que han sido epidemiológicamente implicadas en enfermedades diarreicas. Estas *E. coli* son una importante causa de diarrea en niños de países en desarrollo y aun causan casos esporádicos y brotes ocasionales de enteritis infantil en países industrializados. EPEC no tiene factores de virulencia identificados tales como la capacidad de producir enterotoxinas termoestables ó termolábiles ó verotoxinas ó de invadir la mucosa gástrica; sin embargo, poseen adhesinas (factor de adherencia EAF) que colonizan el intestino delgado y que se hallan implicadas en la patogénesis. Las EPEC son generalmente identificadas por serotipificación. Los serogrupos más comunes son O:55, O:86, O:111, O:114, O:125, O:126, O:127, O:128 y O:142.^{4, 19}

Las cepas que causan la colibacilosis aviar son las enteroinvasivas. La identificación de cepas de EIEC puede hacerse a través de:

1. Invasión a líneas o cultivos celulares.
2. Prueba de Sereny.
3. Prueba de letalidad en embriones de pollo.
4. Hibridación con sondas de DNA derivadas del plásmido de virulencia.
5. Prueba de Elisa indirecta para antígenos de superficie virulentos.
6. Serotipificación y propiedades bioquímicas de colonias sospechosas.
7. PCR (reacción en cadena de la polimerasa).
8. Captación del colorante rojo congo.

Para evaluar la capacidad enteroinvasiva de *E. coli* se han desarrollado técnicas "in vitro" utilizando células HeLa y Hep-2, así como técnicas de hibridación del DNA tanto cromosómico como plasmídico, empleando secuencias de los genes relacionados con la invasión. No obstante, la prueba de referencia para la determinación de la enteroinvasividad de *E. coli* y *Shigella* spp., continua

siendo la prueba desarrollada por Sereny en 1955 que estudia la capacidad de las cepas de producir una queratoconjuntivitis en el ojo del cobayo.^{1, 3, 24, 35}

El fundamento genético de la prueba de Sereny se encuentra en la presencia de un gran plásmido de 140 mega-dalton (Mda) el cual es requerido para la invasividad.¹⁹ También se ha demostrado que este plásmido contiene genes los cuales son esenciales para la unión al rojo congo.^{26, 28, 34}

La búsqueda de marcadores de virulencia fácilmente identificables a conducido a la utilización de la prueba de captación del rojo congo. Las cepas virulentas son capaces de captar el colorante rojo congo del medio sólido produciendo colonias rojas (fenotipo Pcr+), mientras que las cepas no virulentas presentan colonias blancas (fenotipo Pcr-). Berkholf y Vinal en un estudio con el medio rojo congo para determinar la invasividad de *E. coli*, encontraron que la característica de enlazarse al rojo congo constituía un marcador fenotípico moderadamente estable, reproducible y fácilmente distinguible. Concluyeron que las cepas AVEC podían ser identificadas por su capacidad para enlazarse al colorante rojo congo y que la pérdida de la capacidad de unión al rojo congo es paralela a la pérdida de la virulencia para pollos y ratones.^{4, 33}

Los microorganismos que pueden unirse al colorante rojo congo, además de *E. coli* enteroinvasiva, son:

- A) *Shigella* spp..
- B) *Vibrio cholerae*.
- C) *Aeromonas salmonicida*.
- D) *Yersinia enterocolitica*.
- E) *Y. pestis*, y
- F) *Y. pseudotuberculosis*.^{3, 4, 33}

1.3 PATOGENIA Y EPIZOOTIOLOGÍA.

E. coli está presente en el intestino de las aves y mamíferos, diseminándose ampliamente en las heces. Las aves están continuamente expuestas a *E. coli* a través de las heces, agua, polvo y el medio ambiente. Cuando se disminuye la resistencia del ave a enfermedades, las cepas patógenas u oportunistas pueden infectarla. El posible origen de una infección latente es la retención de *E. coli* en lugares como el intestino, fosas nasales, los sacos aéreos o el tracto reproductor.^{14, 15}

Las cepas de *E. coli* aviaries virulentas (AVEC) son las EIEC y pertenecen principalmente a los serogrupos O:1, O:2 y O:78.^{3, 18, 22}

Tanto las especies de *Shigella* como las cepas de *E. coli* invasivas poseen un plásmido de 140 MDa, el cual codifica propiedades esenciales para la penetración bacteriana a las células epiteliales del huésped. Este plásmido, correspondiente a 230 pares de Kilobases, codifica funciones que incluyen:

1. La capacidad de invadir las células epiteliales.
2. Inducción de la endocitosis, así como el escape de las vacuolas fagocíticas.
3. La capacidad de multiplicarse intracelularmente.
4. La capacidad de diseminar la infección a células adyacentes.^{3, 24}

Este plásmido de virulencia muestra puntos de corte para varias endonucleasas de restricción, diferentes a los observados en los plásmidos de virulencia de las distintas cepas de *Shigella*. Por el contrario, cuando se utilizan técnicas de hibridación, se observa que el DNA de ambos plásmidos poseen amplias zonas de homología. Esta homología indica que probablemente hayan derivado de una molécula común y que su evolución a conducido a modificaciones limitadas que afectan las pautas de restricción, aunque se ha conservado la homología global. Tras lograr la expresión de los plásmidos de virulencia de las EIEC en sistemas de minicélulas, se ha llegado a la conclusión de que codifican proteínas de la membrana externa que les permite interactuar con los receptores de las células intestinales.

Posteriormente, se ha demostrado que los genes ipa B, C, D y A, localizados en el plásmido de virulencia, juegan un papel muy importante en el proceso de invasividad de estas cepas, aunque su función exacta no está clara. Probablemente la ejercen a través de la codificación de las proteínas de membrana externa (OMP). La pérdida del plásmido o la delección en estos genes, suprime la invasividad y, por tanto, las transforma en no virulentas.²⁴

Otros factores de virulencia asociados con las cepas aviaries patógenas de *E. coli*, incluyen:

1. La producción de colicinas (Col V).
2. Fimbrias tipo 1 o pilis semejantes a fimbrias tipo 1.^{29, 36}
3. Producción del sideróforo aerobactina.⁷
4. Autoaglutinación en medio ácido.³⁰
5. La resistencia a antibióticos.^{23, 36}
6. La resistencia a la acción lítica del complemento del huésped.^{8, 9, 14, 18, 37}
7. Polisacárido capsular tipo K1.²
8. Presencia del antígeno somático "O".²⁴

1.4. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de la colibacilosis se basa en el aislamiento y tipificación del microorganismo. El establecimiento y aplicación de los diferentes sistemas de tipificación o caracterización tienen por objeto la identificación específica de cepas tipo o grupos bacterianos con el fin de conocer la relación clínica y epizootiológica que existe entre ellos, éste es importante para determinar aspectos de la distribución y foco de infección.²⁵

En algunos casos la sola identificación de especies y antibiograma, son suficientes para establecer o confirmar la relación epizootiológica entre diferentes aislamientos, sin embargo, se ha ido incrementando la necesidad de una detallada tipificación ante el repetido aislamiento de patógenos con idénticos marcadores a partir de una parvada.

En la actualidad existen diversos métodos de tipificación epizootiológica de *E. coli*, éstos incluyen:

1. Análisis de perfiles de plásmidos.²⁵
2. Tipificación serológica.⁶
3. Perfiles de resistencia a antibióticos (antibiograma).⁶
4. Resistotipificación (resistograma).²⁵
5. Perfiles bioquímicos (biotipificación).⁷
6. Perfiles de proteínas de membrana externa.
7. Tipificación de colicinas y hemaglutininas.
8. Análisis de DNA genómico digerido con endonucleasas de restricción.^{2,3}

Cada uno de estos métodos de tipificación presenta diferentes ventajas y desventajas. Gargan y cols., han recomendado combinar la biotipificación y otro esquema de tipificación para poder obtener un esquema confiable.²⁵

Serotipificación. La tipificación rutinaria de *E. coli* con frecuencia involucra el uso de la serología y más recientemente el análisis de plásmidos. Sin embargo, el uso de antisueros "O" para el serotipo, presenta algunos detalles, porque no sólo hay muchas cepas autoaglutinables ó no tipificables sino que también un serogrupo "O" particular puede incluir muchas cepas diferentes. Aún en un laboratorio con un rango completo de antisueros "O", muchas cepas pueden ser no tipificables y la caracterización precisa de las cepas debe incluir la identificación de los antígenos "H" y "K". Más recientemente incluidas en el esquema antigénico para *E. coli* están las proteínas MRE de antígenos fimbriales F. La serotipificación completa O:K:H:F obviamente proporciona excelente discriminación de cepas, pero el gasto y tiempo requeridos para su realización efectivamente restringe su uso. Por consiguiente, en pequeños laboratorios se

requiere de técnicas alternativas las cuales proporcionen una identificación precisa, económica y rápida de cepas individuales para estudios sobre la ecología ó epidemiología de *E. coli*.

El procedimiento de biotipificación de *E. coli* estudia sus patrones de fermentación de azúcares tales como xilosa, salicina, ribosa, adonitol, galactosa, arabinosa, inositol, dulcitol, rafinosa y trehalosa.^{6,7}

La tipificación por antibiograma está basada en la determinación de patrones de susceptibilidad o resistencia de un cierto organismo frente a un panel de antibióticos.

La tipificación mediante patrones de resistencia a antimicrobianos de las cepas de *E. coli* se evalúa usando el método estándar de Kirby Bauer. En este método, se utilizan 32 discos antimicrobianos colocados en placas de agar Mueller Hinton estriados con cultivos de *E. coli*. Después de incubar toda la noche a 37°, se mide el diámetro de cada zona (incluyendo el diámetro del disco) y se interpreta de acuerdo a cartas de referencia del tamaño de zona con cepas control estándar de Brown y Blower y Bauer y cols.^{3, 6, 21, 25}

La resistotipificación es un método basado en la toxicidad selectiva de un grupo cuidadosamente seleccionado de químicos usados a concentraciones críticas.

En este método, propuesto por Guillespie, conocido como inclusión en agar, los compuestos químicos son adicionados al agar (Agar Soya Trypticaseína) antes de que este solidifique, de tal modo que se obtiene un medio sólido a las concentraciones recomendadas. La lectura de los resultados en este método se realiza después de 18 h de incubación mediante la observación de crecimiento o no en la superficie del agar y la interpretación es resistente o susceptible respectivamente, permitiendo la clasificación correcta de las cepas. Las sustancias químicas (colorantes y metales pesados) empleados por Crichton en la discriminación de tipos son: la acriflavina (0.09%), arseniato de sodio (0.75%), nitrato fenil mercurio (0.0006%), sulfato cúprico (0.70%), verde de malaquita (0.003%), ácido bórico (3%) y 4 - cloro - resorcinol (0.70%).^{3, 7, 25} Tales químicos son comúnmente empleados como sanitizantes ó promotores de crecimiento.

La aparente confiabilidad de las diferentes pruebas para identificar las cepas de *E. coli*, según David y cols. fue como sigue: análisis del perfil de plásmidos 65%, tipificación por antibiograma 90%, resistograma 45% y biotipificación 25%. Por lo anterior, se recomienda la combinación de dos

diferentes pruebas tomadas juntas, tales como el análisis del perfil de plásmidos y antibiograma (100% de confiabilidad), o el análisis del perfil de plásmidos y el resistograma (100% de confiabilidad) o el análisis del perfil de plásmidos y la biotipificación (100% de confiabilidad), para proveer un sistema útil y confiable para diferenciar todas las cepas.²⁵

1.5. TRATAMIENTO.

El tratamiento apropiado para un brote temprano de colisepticemia es administrar un antibiótico efectivo o agente quimioterapéutico en el agua de beber.

Es esencial que se inicie la medicación en una fase temprana del desorden. El avicultor debería advertir la presencia del trastorno por la aparición de indicios obvios de depresión en la parvada, conjuntamente con un aumento en el régimen de mortalidad.

Los fármacos que se usan con éxito en el tratamiento de la colisepticemia son:

- A) La nitrofurazona.
- B) Compuestos de penicilina sintética.
- C) La danofloxacin.

La danofloxacin ha demostrado considerable potencia in vitro contra *E. coli* (MIC=0.25µg/ml). La danofloxacin es una fluoroquinolona que inhibe la acción de las enzimas esenciales del DNA y tiene la ventaja de actuar también contra *Pasteurella multocida*, un patógeno también importante de las aves.

Cloud y cols. Encontraron que la mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas en sus ensayos, eran altamente sensibles al cloranfenicol, gentamicina, ácido nalidixico y ormetoprina-sulfadimetoxina.

La elección del medicamento será limitada por la sensibilidad del organismo, disponibilidad y costo del fármaco y ordenanzas en cuanto a su empleo y retiro en las parvadas de pollos de asar. Aparte de la terapia con fármacos se deberá valorar el manejo de las parvadas afectadas y hacer los cambios apropiados en el régimen de ventilación, suministro de calefacción y ajuste en la altura de comederos y bebederos.^{8, 10, 27, 31}

1.6. PREVENCIÓN Y CONTROL.

Para prevenir la mortalidad temprana en pollitos se recomienda seguir las siguientes medidas:

1. Los huevos incubados deben proceder de parvadas que se cree estén libres de colibacilosis.

2. Se deben tomar las medidas adecuadas para disminuir la contaminación de los huevos recién puestos. Se deben fumigar los huevos a nivel de granja antes de su almacenamiento y conservarlos bajo condiciones ideales. Se deben practicar procedimientos escrupulosos de sanidad y fumigación en la planta incubadora.

3. Se debe llevar un programa sanitario estricto en la producción avícola.

4. Se deben reducir tanto como sea posible todas las enfermedades y otras tensiones en las parvadas.

5. Se debe controlar el polvo. Se recomienda usar sistemas humedecedores para prevenir contra la deshidratación de membranas mucosas del tracto respiratorio, así como para precipitar partículas de polvo suspendidas en la atmósfera.

6. Es esencial, para reducir las pérdidas, la activación periódica de extractores, u otros métodos de mejorar la ventilación para reducir el nivel de amoníaco atmosférico en el nivel de la cama.

7. Se debe proporcionar alimento libre de contaminación fecal. Los alimentos empastillados son los más factibles de estar libres de contaminaciones.

8. Se debe monitorear constantemente la presencia de *E. coli* en el suministro de agua. Es esencial que se agregue cloro en el agua contaminada para obtener un nivel de cloro disponible de 1 ppm en el punto de consumo. Se limpiarán y desinfectarán frecuentemente los recipientes destinados como bebederos de agua.

9. Usar programas apropiados de vacunación contra desórdenes respiratorios virales enzóticos, tales como Newcastle, bronquitis infecciosa aviar, coriza y viruela aviar.^{15, 16, 31}

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En general, las infecciones por *E. coli* en aves se cree que son infecciones secundarias; sin embargo, han sido reportados brotes de colibacilosis en los cuales el agente etiológico primario es *E. coli*. La epizootiología y la patogénesis de las infecciones por *E. coli* aún no ha sido bien comprendida, debido a la dificultad para diferenciar las cepas de *E. coli* aviáres virulentas de los invasores secundarios relativamente no virulentos.

La prueba de captación del colorante rojo congo se utiliza comúnmente para diferenciar las cepas de *E. coli* aviáres virulentas de las cepas de *E. coli* no virulentas. Las cepas virulentas tienen la capacidad de unirse al rojo congo, presentando colonias rojas, mientras que las cepas no virulentas presentan colonias claras, translúcidas. Este trabajo tiene la finalidad de llevar a cabo la caracterización de cepas aviáres de *E. coli* rojo congo negativas, realizando las siguientes pruebas:

1. Antibiotipificación.
2. Biotipificación.
3. Resistotipificación.
4. Prueba de Sereny.

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Llevar a cabo la caracterización de cepas de *E. coli* rojo congo negativas de origen aviar.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

A) Demostrar la capacidad invasiva de *E. coli* y *Shigella flexneri* por la prueba de Sereny.

B) Realizar una comparación de los resultados obtenidos entre las pruebas para evaluar la virulencia de *E. coli* rojo congo negativa (Sereny y rojo congo).

C) Determinar el antibiotipo, biotipo y resistotipo de cepas de *E. coli* rojo congo negativas.

D) Determinar si existe alguna relación entre los tipos de *E. coli* rojo congo negativas y los tipos de *E. coli* rojo congo positivas.

E) Conservar a corto y largo plazo las cepas en estudio.

4. HIPÓTESIS.

Debido a la gran cantidad de tipos existentes de *Escherichia coli*, la caracterización de cepas aviarias de *E. coli* rojo congo negativas puede resultar en un amplio número de diferentes biotipos, antibiotipos y resistotipos.

5. MATERIAL Y MÉTODO.

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

CEPAS:

Se trabajaron 85 cepas de *Escherichia coli* rojo congo negativas de origen aviar.

CEPAS EMPLEADAS COMO CONTROLES.

Cepa de *Shigella flexneri* 2b. Sereny positivo y rojo congo positivo. Proporcionada por la M en C Patricia Cauich proveniente de la ENCB (IPN).

Cepa de *E. coli* E11 enteroinvasiva. Sereny positivo y rojo congo positivo. Proporcionada por el Dr. Jorge Girón proveniente de San Antonio, Texas.

Cepa de *E. coli* 1124. Sereny positivo y rojo congo positivo. Proporcionada por el Dr. Héctor Zepeda. Laboratorio de Microbiología Veterinaria (ENCB).

Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Proporcionada por la QBP Graciela Castro Escarpulli. Laboratorio de Bacteriología Médica, ENCB (IPN).

Cepa de *Escherichia coli* K12. Sereny negativa y rojo congo negativa. Proporcionada por la QBP Graciela Castro Escarpulli. ENCB (IPN).

5. 2. METODOLOGÍA.

Se llevó a cabo la recuperación de 85 cepas de *E. coli* rojo congo negativas, aisladas de muestras de órganos de pollos con signos de colibacilosis y conservadas a -70° en congelador Revco. Para recuperarlas, se sembró cada una de las cepas en caldo soya tripticaseína (TSB) y se incubaron a 37° durante 24 horas. Posteriormente se sembró cada cepa en agar soya tripticaseína (TSA) y agar MacConkey para confirmar su pureza.^{16,17} Una vez demostrada la pureza de las cepas se sembró cada una de ellas en agar rojo congo, para comprobar que las cepas realmente correspondían a cepas de *E. coli* rojo congo negativas. Las cepas identificadas como *E. coli* rojo congo negativa (Foto No. 1) se trabajaron mediante el siguiente esquema general (figura No. 1).

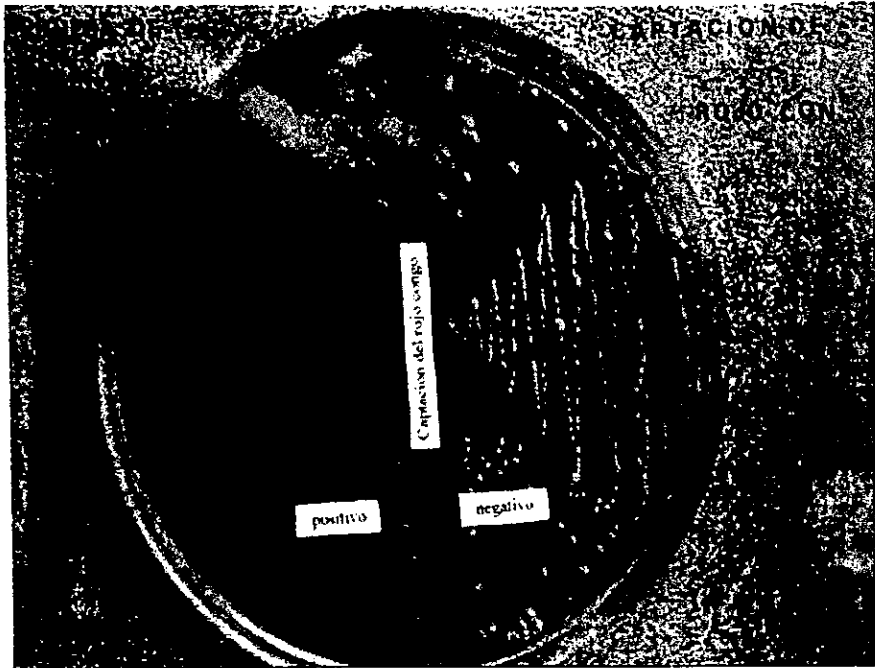
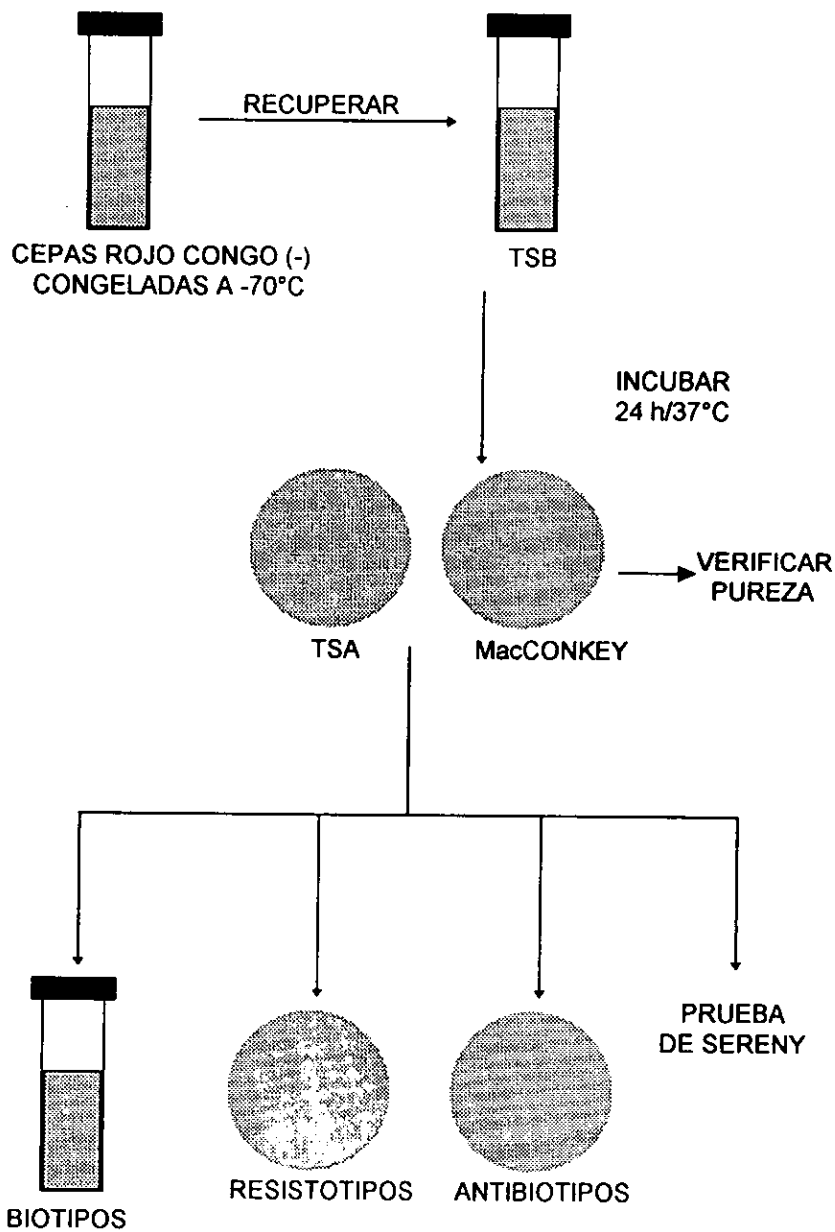


FOTO No. 1. PRUEBA DE CAPTACIÓN DEL ROJO CONGO
(Permiso de reproducción: QBP Graciela Castro Escarpulli, Laboratorio de Bacteriología Médica, ENCB, IPN)

FIGURA No. 1.
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



5.2.1. ANTIBIOTIPO: MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY - BAUER) ^{3, 6, 21, 25}

1. Se tomó una colonia bien aislada de un cultivo de 24 horas en placas con medio TSA y se inoculó dentro de un tubo con 3 ml de caldo Mueller Hinton.
2. Se dejó incubando a 37 °C durante 2 a 3 horas.
3. Se ajustó el crecimiento a la turbidez del 0.5 de Mac Farland.
4. Con la ayuda de un hisopo estéril se sembró en forma masiva en placas con agar Mueller Hinton.
5. Se colocaron los discos con los antibióticos de prueba (Tabla No. 1).
6. Se incubó a 37°C durante 18 a 24 horas. Posteriormente se hizo la lectura de los halos de inhibición (Figura No. 2).
7. Como cepa estándar se empleó una *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.2.2. BIOTIPIFICACIÓN ^{3, 6, 7, 25}

1. Se sembró cada una de las cepas en estudio en agar MacConkey y se dejó incubar a 37 °C durante 18 a 24 horas.
2. Se tomó una asada de las cepas anteriores y se inoculó, según el criterio de Crichton, en una serie de tubos con caldo base rojo de fenol adicionado con el 1% de los azúcares de prueba (Tabla No. 2), así como de la ornitina en base de MIO (Figura No. 3).
3. La prueba para fermentación se considera positiva si hay vire del indicador de rojo a amarillo después de incubar a 37 °C durante 24 horas.
4. Como cepa estándar se utilizó una *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.2.3. RESISTOTIPIFICACIÓN (MÉTODO DE INCLUSIÓN EN AGAR) ^{3, 6, 7, 25}

1. De un cultivo de 18 horas de crecimiento en TSA, se tomó una colonia bien aislada y se inoculó en tubos de ensaye con 3 ml de TSB.
2. Se incubó de 2 a 4 horas a 37 °C.
3. El crecimiento se ajustó a la turbidez del 0.5 de Mac Farland, y se depositaron 5 µl del cultivo en placas con los diferentes químicos de prueba (Tabla No. 3).
4. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se observó la presencia o no de crecimiento en la superficie del medio de prueba (Figura No. 4).
5. Como cepa estándar se utilizó una *Escherichia coli* ATCC 25922.

FIGURA No. 2.
TIPIFICACIÓN POR ANTIBIOGRAMA: SENSIBILIDAD
ANTIMICROBIANA ^{3, 6, 21, 25}

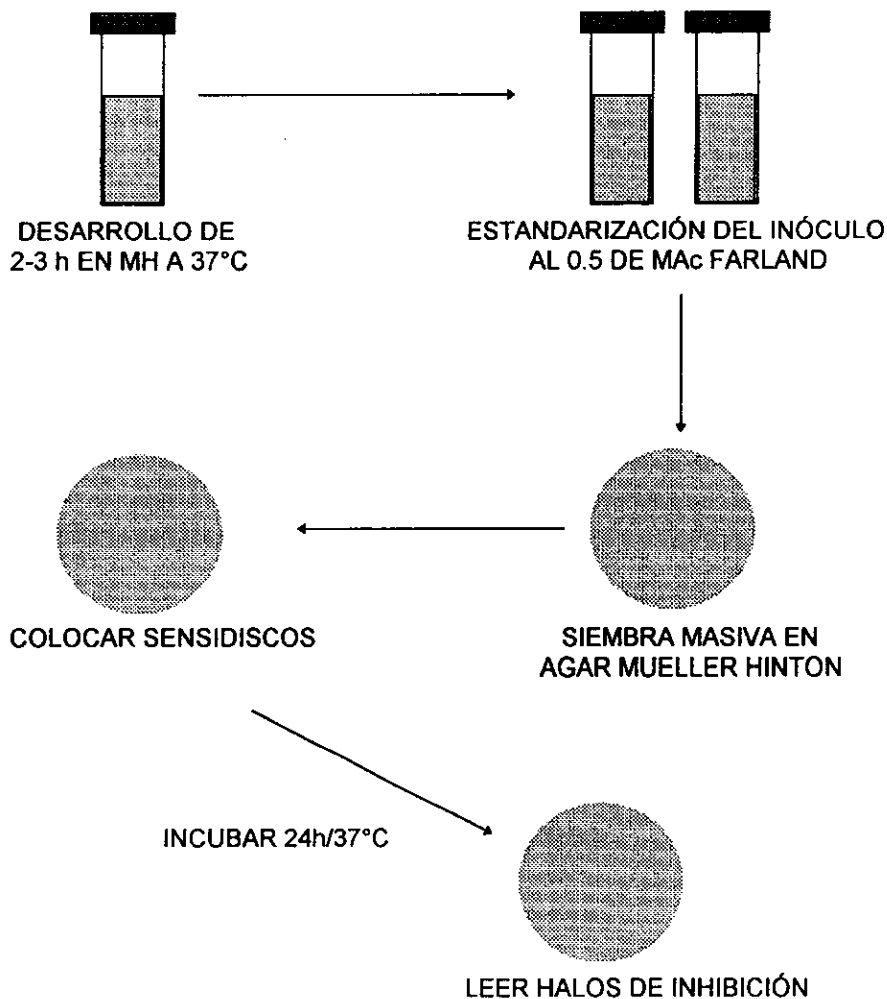
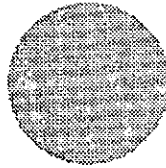


TABLA No. 1

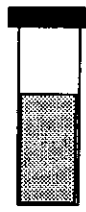
ANTIMICROBIANOS PROBADOS ^{3, 6, 25}

AMPICILINA	10 µg
CLORANFENICOL	30 "
GENTAMICINA	10 "
KANAMICINA	30 "
ÁCIDO NALIDÍXICO	30 "
NEOMICINA	30 "
POLIMIXINA B	300 U
ERITROMICINA	15 µg
ESTREPTOMICINA	10 "
TETRACICLINA	30 "

FIGURA No. 3.
BIOTIPIFICACIÓN ^{3, 7, 25}



CULTIVO DE 24h EN
AGAR MacCONKEY

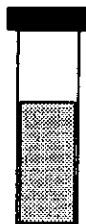


BASE CALDO ROJO
DE FENOL + AZÚCARES

BASE MIO



INCUBAR 24h/37°C



RESULTADO +: VIRE DEL INDICADOR
RESULTADO -: SIN VIRE DEL INDICADOR

TABLA No. 2.

BIOTIPIFICACIÓN DE *E. coli* DE ACUERDO AL CRITERIO DE CRICHTON^{3, 6, 7, 25}

BIOTIPO	RAFINOSA	SORBITOL	ORNITINA	DULCITOL
1.	+	+	+	+
2.	+	+	+	-
3.	+	+	-	+
4.	+	+	-	-
5.	+	-	+	+
6.	+	-	+	-
7.	+	-	-	+
8.	+	-	-	-
9.	-	+	+	+
10.	-	+	+	-
11.	-	+	-	+
12.	-	+	-	-
13.	-	-	+	+
14.	-	-	+	-
15.	-	-	-	+
16.	-	-	-	-

FIGURA No. 4.
RESISTOTIPIFICACIÓN: MÉTODO DE INCLUSIÓN EN AGAR ^{3, 7}

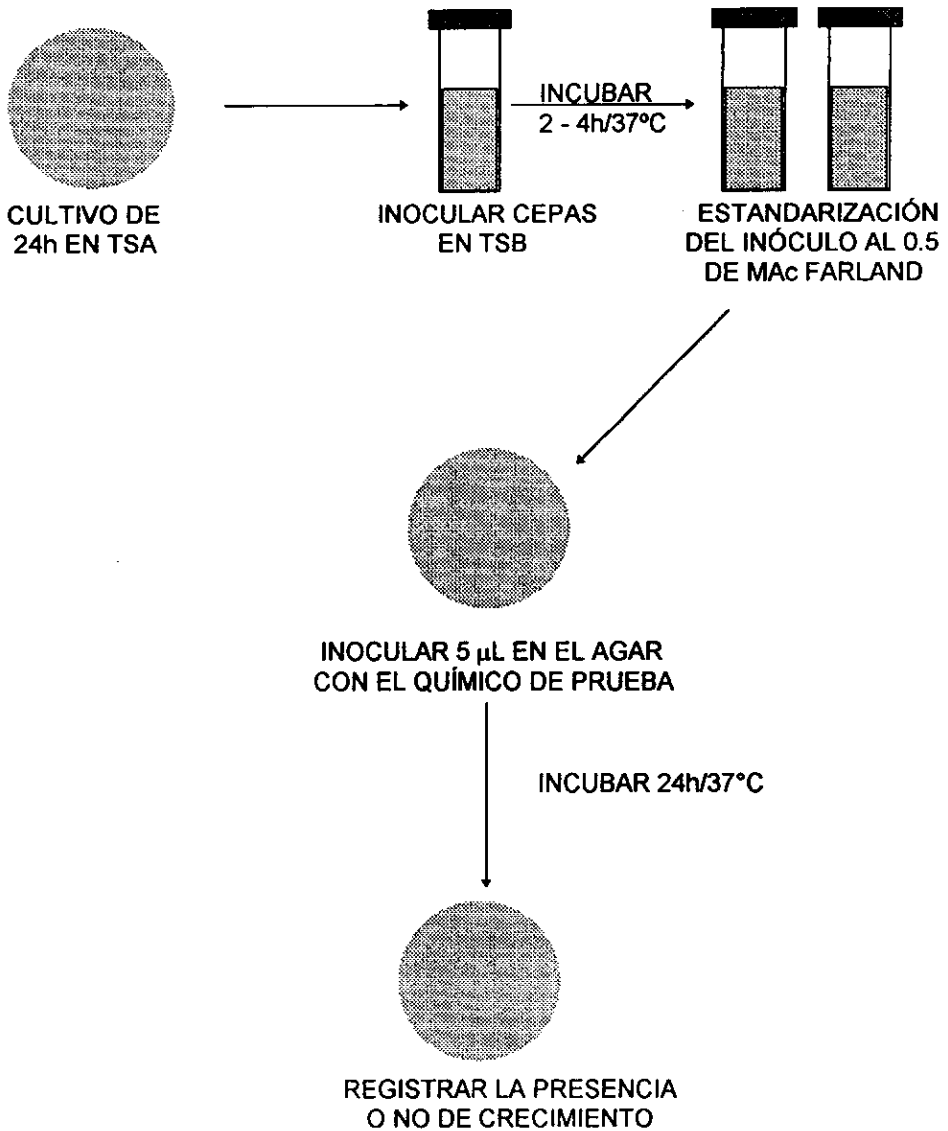


TABLA No. 3.

RESISTOTIPO: QUÍMICOS Y COLORANTES PROBADOS ^{3.7}

ACRIFLAVINA	0.09 %
ARSENIATO DE SODIO	0.75 %
NITRATO FENIL MERCÚRICO	0.003 %
SULFATO DE COBRE	0.70 %
VERDE DE MALAQUITA	0.0006 %

5.2.4. PRUEBA DE SERENY (MODIFICACIÓN DE FANTINATTI) ^{3, 9, 35}

1. De un cultivo de 24 h. en placas con agar infusión cerebro corazón (BHI) sembradas masivamente e incubadas a 37 °C, se cosechó todo el crecimiento.
2. El crecimiento se depositó en tubos de ensaye de 13 x 100 los cuales contenían 1 ml de PBS (Solución amortiguadora de fosfatos) pH 7.2.
3. Se agitó hasta obtener una suspensión homogénea (suspensión con aproximadamente 5×10^9 Unidades Formadoras de Colonia por ml).

INOCULACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

1. Se inocularon 25 μ l de la suspensión bacteriana en la conjuntiva del ojo derecho del cobayo previamente identificado, marcado con el número de cepa de prueba.
2. Se examinó diariamente el curso de la infección durante un período de 4 días (96 horas).
3. Como control positivo la misma prueba fue realizada con 25 μ l de un cultivo de *S. flexneri* 2b ó *E. coli* E11 conteniendo el mismo número de bacterias aproximadamente. Como testigo negativo, se inocularon 25 μ l de una suspensión de cepas de *E. coli* K12 en el ojo izquierdo de otro cobayo albino adulto. ^{3, 8}

Interpretación. Las cepas Sereny positivas producen queratoconjuntivitis, que se manifiesta dentro de las 96 horas después de la inoculación, observándose enrojecimiento e inflamación de la zona parpebral y queratinización de la conjuntiva del cobayo (Figura No. 5 y Foto No. 2).

FIGURA No. 5
PRUEBA DE SERENY 3, 9, 35

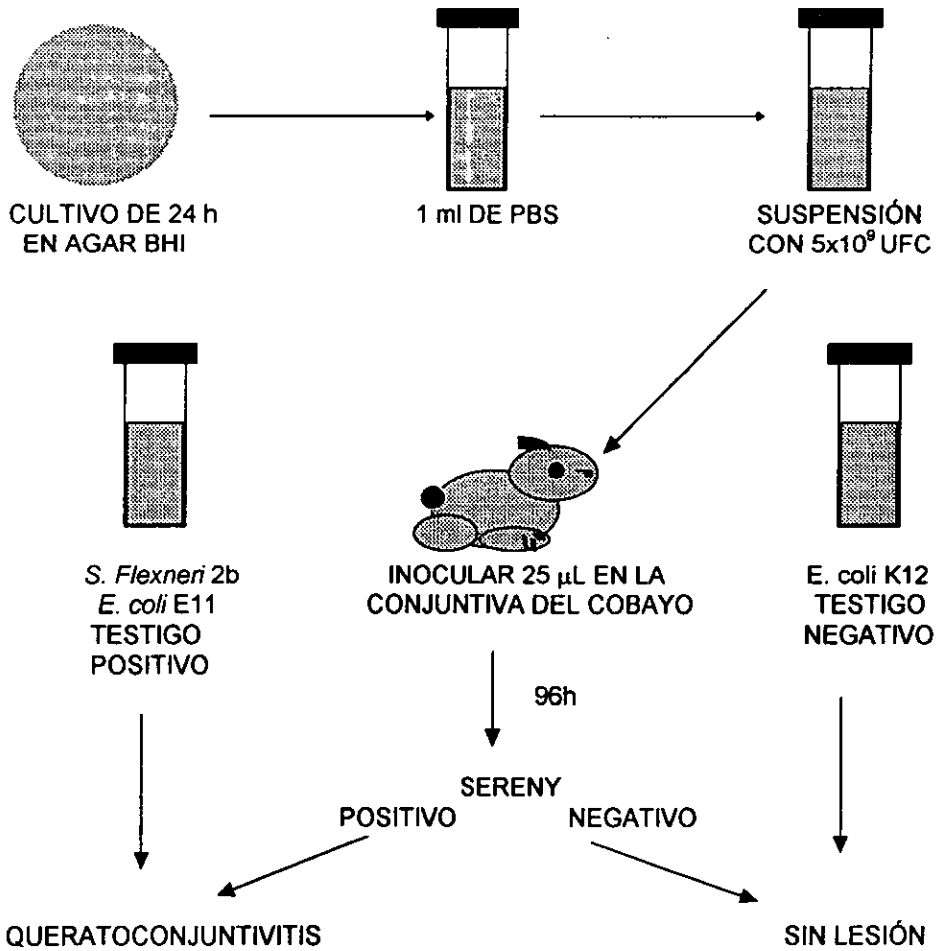




FOTO No 2. PRUEBA DE SERENY
(Permiso de reproducción: M en C Patricia Cauich, ENCB)

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN EMPLEADOS

- A) Conservación a corto plazo: medio base agar sangre.
- B) Conservación a largo plazo: congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A) Corto plazo.

1. Se inculó cada una de las cepas en tubos con medio inclinado de base de agar sangre.
2. Se incubó cada cepa durante 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Después de este período se sustituyó el tapón de algodón por uno de corcho o plástico estéril.
4. Se procedió a sellar los tubos usando papel parafilm. Este método de conservación se recomienda para un período de 3 meses.

B) Congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1. Se tomó una asada gruesa del crecimiento en placas con TSA y se depositó en críotubos con 1 ml de caldo de Todd Hewitt con glicerol al 40%.
2. Se etiquetaron debidamente los críotubos.
3. Se acomodaron los críotubos en cajas especiales diseñadas para éstos y se introdujeron en el refrigerador Revco a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este método de conservación se recomienda para períodos de un año en adelante. ³

6. RESULTADOS.

Se trabajaron 85 cepas de *Escherichia coli*, de las cuales todas resultaron rojo congo negativas.

Los resultados arrojados por el antibiograma (Tabla No. 4), indican que la mayoría de las cepas son resistentes a la eritromicina en un 96.4 %, a la tetraciclina en un 91.7 %, al ácido nalidíxico en un 90.5 % y a la estreptomina en un 89.4 %. Por otro lado, las cepas resultaron sensibles a la polimixina B, la neomicina y el cloranfenicol (Gráfica No. 1).

Se encontró que de las 85 cepas trabajadas, 74.1 % (63 cepas) fueron rafinosa positivas; 91.7 % (78 cepas) fueron sorbitol positivas; 76.4 % (65 cepas) fueron ornitina positivas y 89.4 % (76 cepas) dulcitol positivas. Encontrándose, según el esquema de Crichton, que los biotipos más comunes son el 1 (55.2 %), el 11 (11.7 %), el 3 (10.5 %), el 2 (7.0 %) y el 9 (7.0 %) (Tablas No. 5 y No. 6).

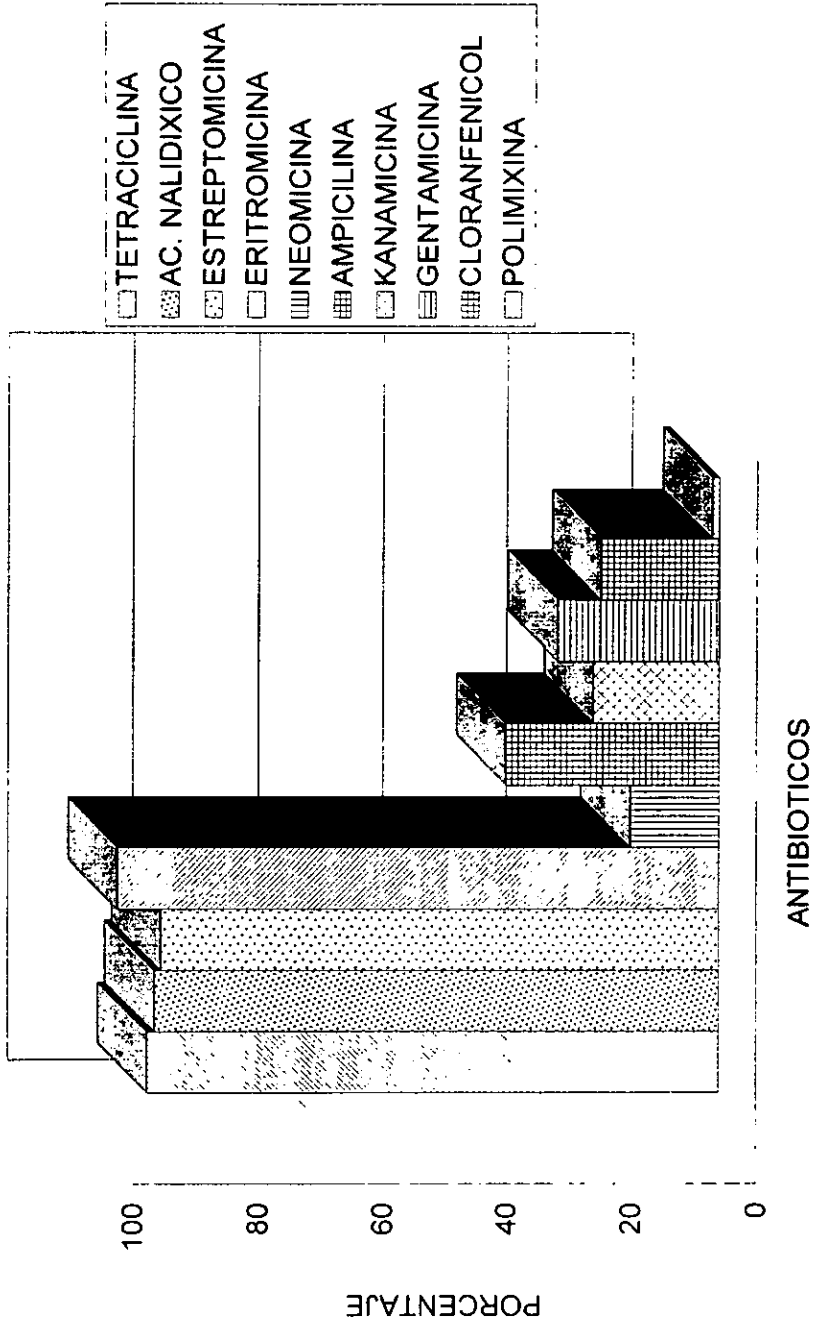
En cuanto al resistotipo (Tabla No. 7), el 100 % de las cepas de *E. coli* resultaron sensibles al nitrato fenil mercúrico y al sulfato de cobre; y también resultaron sensibles en gran proporción a la acriflavina (97.6 %). Por otra parte se encontró que todas las cepas fueron resistentes al verde de malaquita (100 %). Mientras que para el arseniato de sodio aproximadamente la mitad de las cepas resultaron resistentes a este químico (49.4 %) (Gráfica No. 2).

Todas las cepas de *E. coli* rojo congo negativa dieron un resultado negativo a la prueba de Sereny. Del total de cepas sólo el 4.7 % (4 cepas) fueron lactosa negativo o tardío y el 9.4 % (8 cepas) resultaron inmóviles.

Los métodos de conservación empleados a corto y largo plazo dieron buenos resultados, ya que se obtuvo un desarrollo satisfactorio, después de la recuperación, en ambos métodos.

TABLA No. 4.**RESISTENCIA ANTIMICROBIANA IN VITRO DE CEPAS DE *E. coli*
AISLADA DE POLLOS**

ANTIBIÓTICO	POTENCIA DEL DISCO	% RESISTENCIA
AMPICILINA	10 mg	34.1
CLORANFENICOL	30 "	18.8
GENTAMICINA	10 "	25.8
KANAMICINA	30 "	20.0
NEOMICINA	30 "	14.1
POLIMIXINA B	300 U	1.1
ERITROMICINA	15 mg	96.4
TETRACICLINA	30 "	91.7
ÁC. NALIDÍXICO	30 "	90.5
ESTREPTOMICINA	10 "	89.4



GRÁFICA No. 1. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE 85 CEPAS DE *E. coli* AISLADAS DE POLLOS

TABLA No. 5.

**FERMENTACIÓN DE AZÚCARES Y ACTIVIDAD DE ORNITINA
DESCARBOXILASA DE *E. coli* AISLADA DE POLLOS**

SUSTRATO	CEPAS POSITIVAS/TOTAL (%)	
RAFINOSA	63/85	74.1 %
SORBITOL	78/85	91.7 %
ORNITINA	65/85	76.4 %
DULCITOL	76/85	89.4 %

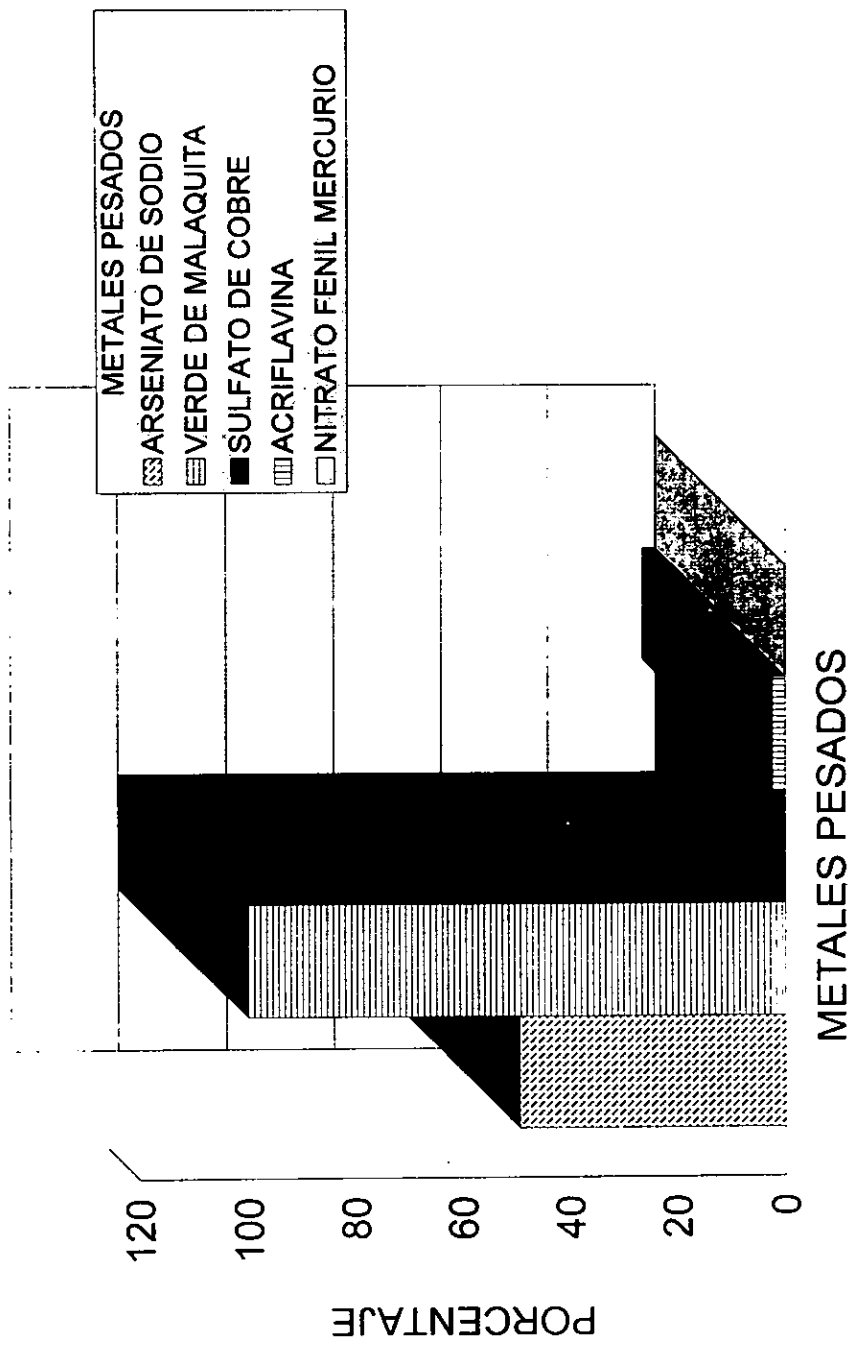
TABLA No. 6.**BIOTIPOS DE *E. coli* AISLADA DE POLLOS SEGÚN EL ESQUEMA DE CRICHTON**

BIOTIPO	No DE CEPAS/TOTAL (%)	
1	47/85	55.3 %
11	10/85	11.8 %
3	9/85	10.5 %
2	6/85	7.0 %
9	6/85	7.0 %
13	3/85	3.5 %
14	2/85	2.3 %
5	1/85	1.2 %
16	1/85	1.2 %
TOTAL	85/85	99.9 %

TABLA No. 7.

**RESISTENCIA A METALES PESADOS Y COLORANTES DE
E. coli AISLADA DE POLLOS**

QUÍMICO	CEPAS RESISTENTES/TOTAL (%)	
NITRATO FENIL MERCURICO	0/85	0.0 %
SULFATO DE COBRE	0/85	0.0 %
ACRIFLAVINA	2/85	2.4 %
ARSENIATO DE SODIO	42/85	49.4 %
VERDE DE MALAQUITA	85/85	100.0%



GRÁFICA No 2 RESISTENCIA A METALES PESADOS
DE 85 CEPAS DE *E. coli* AISLADAS DE POLLOS

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Se encontró un alto nivel de resistencia a los antibióticos probados; muchas de las cepas aisladas exhiben resistencia a más de dos antibióticos, pero no se observan patrones de resistencia claros. Sin embargo, hubo una marcada resistencia a la eritromicina, a la tetraciclina, al ácido nalidíxico y a la estreptomina. Para estos antibióticos, la resistencia fue superior del 89%. Sólo la polimixina B, la neomicina y el cloranfenicol fueron los únicos antibióticos a los cuales la mayoría de las cepas de *E. coli* rojo congo negativa resultaron sensibles.

La resistencia mostrada ante el primer bloque de antibióticos, se debe, sin duda alguna a que han sido los antibióticos más comúnmente empleados en la avicultura, además, de que la eritromicina, al igual que todos los macrólidos, se han utilizado preferentemente frente a bacterias Gram positivas, para los que resulta más eficaz este antimicrobiano, así mismo el desarrollo de resistencia frente a una tetraciclina, trae como consecuencia la resistencia a todas las tetraciclinas, y, además, aunque la estreptomina es raramente usada, la alta incidencia de resistencia a este compuesto puede estar asociada con un plásmido transferible y que también lleva resistencia contra tetraciclinas;^{6, 23, 25} todo ésto en conjunto ha provocado que las cepas vayan resultando más resistentes a estos antibióticos y se hayan ido seleccionando. Estos datos concuerdan con los reportes de Allan, Cloud y Aquino.^{2, 3, 6} Por otro lado, aunque en este trabajo se encontró una menor resistencia a la polimixina B, la neomicina y el cloranfenicol, Allan reporta sólo al cloranfenicol y a la ampicilina como antibióticos a los cuales *E. coli* es sensible;² Aquino reporta a la polimixina B, al cloranfenicol y a la cefalotina, aunque para cepas rojo congo positivas³ y Premkumar reporta, que todas las cepas en su estudio fueron sensibles a la polimixina B, al ácido nalidíxico, a la gentamicina, a la cefaloridina y a la cefalexina.²⁵ La neomicina, al igual que la gentamicina, resulta eficaz frente a bacilos Gram negativos, por tanto, la sensibilidad mostrada por las cepas ante la neomicina no resulta un dato incongruente en este trabajo.

Según el esquema de biotipificación propuesto por Crichton, se encontró que los biotipos más comunes de *E. coli* rojo congo negativa son el 1, el 11 y el 3. Según lo reportado por Aquino, los biotipos más comunes de *E. coli* rojo congo positiva son el 1, el 3, el 4 y el 11.³

En cuanto al resistotipo se encontró que el 100% de las cepas fueron sensibles al nitrato fenil mercúrico y al sulfato de cobre y más del 97% sensibles a la acriflavina. Sólo casi la mitad (49.4%) resultó resistente al arseniato de sodio y todas, el 100% resultaron resistentes al verde de malaquita. El hecho de

encontrar todas las cepas sensibles al nitrato fenil mercúrico se debe, con toda seguridad a la acción del mercurio. Los metales pesados actúan desnaturalizando las enzimas celulares por supresión de grupos sulfhidrilo libres. Hay muchas enzimas en los microorganismos, cuyas cadenas laterales terminan en grupos sulfhidrilo y no pueden funcionar, a menos que estos grupos sulfhidrilo (-SH) permanezcan libres y no reducidos. Entre los metales pesados más activos, además del mercurio y la plata, se encuentra también el cobre, lo que explica que las cepas de *E. coli* hayan resultado sensibles al sulfato de cobre. La acriflavina también se ha usado como desinfectante y casi todas las cepas resultaron sensibles a este colorante. La resistencia encontrada al arseniato de sodio posiblemente se deba a la presencia de este compuesto como contaminante del ambiente. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Aquino, aunque ella reporta un 80% de resistencia al arseniato de sodio, sin embargo lo reporta para cepas rojo congo positivas.³ Por otro lado, Premkumar reporta datos diferentes, encontrando una resistencia del 100% al nitrato fenil mercúrico y del 95% al sulfato de cobre, explicando que probablemente se deba a que estos químicos son frecuentemente encontrados en la India, siendo el sulfato de cobre utilizado como un aditivo del alimento de las aves y el nitrato fenil mercúrico frecuentemente aparece como un contaminante industrial.²⁵

Aunque se han desarrollado numerosas técnicas *in vitro* para determinar la invasividad de *E. coli*, la prueba de referencia para determinar la enteroinvasividad de *E. coli* y *Shigella* spp., continua siendo la prueba desarrollada por Sereny. Todas las cepas rojo congo negativas, las cuales fueron aisladas de órganos internos de aves, resultaron Sereny negativas. Esto concuerda bien con lo reportado por Berkhoff y Stebbins, quienes encontraron que las cepas rojo congo positivas son virulentas y las cepas rojo congo negativas son no virulentas.^{5, 33} Sin embargo, Albert, reportó haber encontrado cepas rojo congo positivas que no se hibridizaron con la sonda de DNA para invasividad y Spears encontró cepas rojo congo negativas capaces de resistir la acción del complemento y de causar la muerte en embriones de pollo, ambas características asociadas con la virulencia.^{1, 31, 32} Además, Aquino reporta que no existe correlación alguna entre la prueba de Sereny y las cepas rojo congo positivas.³ Indudablemente deben hacerse más estudios con cepas rojo congo positivas, con el fin de establecer la verdadera utilidad de la prueba de rojo congo.

Por otra parte, el 95.3% de las cepas fueron lactosa positivo y el 90.6% resultaron móviles. Estas características no son propias de las EIEC, las cuales son lactosa negativas o tardías y generalmente son inmóviles.² Por lo que, aunque estas cepas fueron aisladas de órganos de aves con signos de colibacilosis, tal parece, que se trata de cepas oportunistas.

8. CONCLUSIONES.

1. Se obtuvo un alto porcentaje de resistencia a los antibióticos por parte de las cepas aisladas. La eritromicina, la tetraciclina, el ácido nalidíxico y la estreptomina fueron los antibióticos a los cuales *E. coli* rojo congo negativa presentó mayor resistencia.

2. Los biotipos más comunes de *E. coli* rojo congo negativa según el criterio de Crichton fueron el 1, el 11 y el 3.

3. El resistotipo de las *E. coli* rojo congo negativa es heterogéneo; resultando sensibles al nitrato fenil mercúrico, al sulfato de cobre y a la acriflavina.

4. Todas las cepas de *E. coli* rojo congo negativa resultaron Sereny negativas, la mayoría resultaron lactosa positivas y también móviles.

5. Todas las cepas de *E. coli* rojo congo negativa fueron aisladas de pollos con signos de colibacilosis, por lo que se propone desarrollar un modelo diferente con cultivos primarios de tráquea de pollo como una alternativa para demostrar la invasividad.

6. Los métodos de tipificación empleados aquí, pueden ser de gran utilidad como técnicas alternativas las cuales proporcionen una identificación precisa, económica y rápida de cepas individuales para estudios sobre la epizootiología de *Escherichia coli*.

9. APÉNDICE.

CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO. ^{10, 11, 16, 17}

Cada lote de medio de cultivo debe someterse a las siguientes pruebas:

1. Determinación de pH. Ésta se efectuó a 25°C usando un potenciómetro validado.
2. Prueba de esterilidad. Se sometió a esta prueba el 4% de las unidades preparadas por cada lote. Los medios se incubaron a 35°C - 37°C durante 24 a 48 horas.
3. Prueba de promoción de crecimiento.
4. Estabilidad (Caducidad). Los medios se mantuvieron almacenados a 2°C - 8°C.

MEDIO	pH	ESTERILIDAD	ESTABILIDAD	PROMOCIÓN
TSA	7.3	OK	6 semanas	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (Desarrollo en 24h).
MacConkey	7.1	OK	4 semanas	<i>E. coli</i> ATCC25922 (Colonias rosadas) <i>S. typhimurium</i> ATCC14028 (colonias incoloras) <i>S. faecalis</i> ATCC 29212 (Inhibición)
Mueller-Hinton	7.3	OK	4 semanas	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Agar BHI	7.4	OK	6 semanas	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305 (Desarrollo en 24h).
TSB	7.3	OK	"	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305 (Desarrollo)
MIO	6.6	OK	"	<i>E. coli</i> ATCC 25922 Movilidad, Indol y Ornitina: + <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13046 Movilidad, Indol y Ornitina: -
Caldo MH	7.3	OK	"	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (Desarrollo)
Caldo base-Rojo de fenol	7.4	OK	"	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (Desarrollo)

LÍMITES DE CONTROL PARA EL MONITOREO DEL DIÁMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN DE CEPAS TESTIGO ^{17, 21}

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	<i>E. coli</i> ATCC 25922
AMPICILINA	10 µg	16 - 22 mm
CLORANFENICOL	30 "	21- 27 "
GENTAMICINA	10 "	19 - 22 "
KANAMICINA	30 "	17 - 25 "
ÁCIDO NALIDÍXICO	30 "	22 - 28 "
NEOMICINA	30 "	17 - 23 "
POLIMIXINA B	300 U	12 - 16 "
ERITROMICINA	15 µg	8 - 14 "
ESTREPTOMICINA	10 "	12 - 20 "
TETRACICLINA	30 "	18 - 25 "

CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS Y COLORANTES ¹⁷

Los reactivos utilizados en los laboratorios de microbiología incluyen los colorantes, productos químicos y antimicrobianos. Todos deben ser controlados para obtener resultados correctos. Los colorantes y productos químicos obtenidos de fuentes reputadas deben etiquetarse con el número de lote y fecha de recepción, apertura, preparación y caducidad. La eficacia y estabilidad pueden asegurarse si cada vez se adquieren o preparan pequeñas cantidades. Antes de su uso se deben realizar pruebas de la función de cada lote, así como a intervalos adecuados durante la vida de este lote. Estos intervalos dependen de la estabilidad inherente del reactivo o colorante, y de la frecuencia de su utilización.

SUSTANCIA	MARCA	PUREZA
ACRIFLAVINA	ALDRICH	90 %
ARSENIATO DE SODIO	SIGMA	99 %
DULCITOL	ALDRICH	97 %
NITRATO FENIL MERCÚRICO	ALDRICH	87 %
RAFINOSA	SIGMA	99 %
ROJO CONGO	ALDRICH	85 %
SORBITOL	SIGMA	98 %
SULFATO DE COBRE	SIGMA	99 %
VERDE DE MALAQUITA	SIGMA	90 %

CONTROL DE CALIDAD EN ANIMALES DE LABORATORIO

El manejo adecuado de los recursos de un laboratorio animal requiere de personal bien entrenado, lo cual garantiza una alta calidad en el cuidado de los animales.

Se define como "manejo adecuado" a cualquier sistema de alojamiento y cuidado que permite a los animales crecer, madurar, reproducirse y comportarse normalmente y ser mantenidos en confort físico y con buena salud; ésto implica control ambiental y genético para minimizar variaciones que puedan modificar la respuesta del animal a un régimen experimental determinado.

Este concepto es esencial para el control de los animales y la validez de los datos de investigación.

CARACTERÍSTICA	ANIMAL: COBAYO
Raza	Inglés de pelo corto
Peso promedio al nacer	75 - 100 g
Período de lactancia	14 - 21 días
Ingestión de sólidos	A los 5 días
Días de gestación	62 - 72 días
Número por camada	1 - 4
Número de camadas	2 - 4 /año
Separación de adultos durante el parto y destete	No
Peso del adulto	(H) 850 g (M) 1000 g
Vida (años)	4 - 5 años
Consumo diario de agua por adulto	10 ml /100 g de peso corporal
Consumo diario de alimento por adulto	30 - 35 g
Dieta	Comida comercial para cobayos, Heno de buena calidad, col, legumbres y frutas.
Temperatura ambiente	20 - 22 °C
Alojamiento	Cajas de plástico
Área del piso/animal	Mínimo 277 cm ²
Altura	Mínimo 17.8 cm ²
Humedad (%)	50
Ciclo diurno	14 h de luz al día
Vida productiva	(H) 3 - 5 años (M) 4 - 5 años

GLOSARIO

Aerosaculitis. La aerosaculitis es una enfermedad respiratoria de las aves, frecuentemente causada por *E. coli*, y se caracteriza por el engrosamiento e inflamación de los sacos aéreos con exudado fibrinoso.

Enzoótico. Enfermedad en animales restringida a una localidad.

Epidémico. Que afecta a un gran número de individuos al mismo tiempo.

Epizootiológico. El estudio de la presencia de enfermedades infecciosas, su origen y patrones de difusión a través de una población animal.

Pandemia. Se aplica normalmente a una epidemia de proporciones extraordinariamente grandes, que afecta frecuentemente a todo el mundo.

Patogenicidad. La patogenicidad se refiere a la capacidad potencial del microorganismo para provocar la enfermedad

Sacos aéreos. Espacios llenos con aire y conectados con los pulmones en las aves.

Virulencia. La virulencia se refiere al grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie.

9. REFERENCIAS.

1. Albert M. J., Leach A. 1989. Lack of correlation between congo red binding and enteroinvasiveness in *Escherichia coli*. J Infect Dis 160: 169 - 170.
2. Allan B. J., Van der Hurk J. V., Potter A. A. 1993. Characterization of *Escherichia coli* isolate from cases of avian colibacillosis. Can J Vet Res 57: 146 - 151.
3. Aquino B. E. A. 1995. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* aisladas de aves con colibacillosis. Tesis de licenciatura. ENCB-IPN. México.
4. Blanco J. E., Blanco M., Blanco J. 1995. *Escherichia coli* enterotoxigénicas, verotoxigénicas y necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre. Microbiología SEM 11: 97 - 110.
5. Berkhoff A., Vinal A. C. 1985. Congo red medium to distinguish between invasive and no invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry. Avian Dis 30: 117 - 121.
6. Cloud S. S., Rosenberger J. K., Fries P. A., Wilson R. A., Odor E. M. 1985. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity and antibiotic sensitivity. Avian Dis 29: 1084 - 1093.
7. Crichton P. B., Old D. C. 1985. The virulence of *Escherichia coli* reviews and methods. Academic Press, USA: 315 - 330.
8. Emery D. A., Nagaraja K. V., Shaw D. P., Newman J. A., White D. G. 1992. Virulence factors of *Escherichia coli* in chickens and turkeys Avian Dis 36: 504 - 511.

9. Fantinatti F., Silveira W. D., Castro A. F. P. 1994 Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* 41: 75 - 86.
10. Guía de validación de medios de cultivo. 1990. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud. S.S. Subcomité de Microbiología. México.
11. Guía para el control microbiológico de alimentos. 1992. Monografía técnica No. 4. Cipam. México.
12. Kapur V., White D. G., Wilson R. A., Whittam T. S. 1992. Outer membrane protein patterns mark clones of *Escherichia coli* O2 and O78 strains that cause avian septicemia. *Infect Immun* 60: 1687 - 1690.
13. Krogfelt K. A. 1991. Bacterial adhesion: genetic, biogenesis and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* 13: 721 - 730.
14. Leitner G., Heller E. D. 1992. Colonization of *Escherichia coli* in young turkeys and chickens. *Avian Dis* 36: 211 - 220.
15. Manual de las enfermedades de las aves. 1983. 2a edición. Asociación Americana de Patólogos Aviarios, Pennsylvania.
16. Manual de medios de cultivo. 1982. Bioxon, México, D. F..
17. Manual of BBL products and laboratory procedures. 1988. 6th ed. Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland.
18. Martin M. A. 1987. Patogénesis de la colibacilosis. *Avances de Medicina Veterinaria* 3: 88-94.
19. Muhldorfer I., Hacker J. 1994. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis* 16: 171 - 181.

20. Nakamura K., Cook J. K. A., Frazier J. A., Narita M. 1992. *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infectious bronchitis virus and/or *Escherichia coli*. *Avian Dis* 36: 881 - 890.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Approved standard: M2 - A4. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 4 th ed. NCCLS, Villanova, Pa.
22. Nolan L. K. , Wooley R. E., Brown J., Spears K. R., Dikerson H. W., Dekich M. 1992. Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 36: 395 - 397.
23. O'Brien T. F., DiGiorgio J., Parsonnet K. C., Kass E. H., Hopkins J. D. 1993. Plasmid diversity in *Escherichia coli* isolate from processed poultry and poultry processors. *Vet Microbiol* 35: 243 - 255.
24. Prats G., Llovet T. 1995. *Escherichia coli* enteroinvasiva patogenia y epidemiología. *Microbiología SEM* 11: 91 - 96.
25. Prenkumar D. B., Purushothaman V., Venkatesan R. A. 1991. Comparison of plasmid profile analysis, antibiogram testing, resistotyping and biotyping in the identification of *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Rec* 129: 94 - 97.
26. Qadri F., Hossain S. A., Ciznar Y., and cols. 1998. Congo red binding and salt aggregation as indicators of virulence in *Shigella* species. *J Clin Microbiol* 26: 1343 - 1348.
27. Raemdonck D. L., Tanner A. C., Tolling S. T., Michener S. L. 1992. In vitro susceptibility of avian *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* to danofloxacin and five other antimicrobial. *Avian Dis* 36: 964 - 967.
28. Sasakawa C., Kamata K., Sakai T., Murayama S. Y., Makino S., Yoshikawa M. 1986. Molecular alteration of the 140 megadalton plasmid associated with loss

of virulence and congo red binding activity in *Shigella flexneri*. Infect Immun 51: 470 - 475.

29. Sekisaki T., Miyazaki S., Ito H., Asawa T., Nonomura I. 1992. Isolation and characterization of type 1 fimbriae from chicken pathogenic *Escherichia coli* serotype O78. J Vet Med Sci 54: 1145-1149.

30. Sekisaki T., Nakasato Y., Nonomura I. 1992. Acid induced autoagglutination found in chicken pathogenic *Escherichia coli* strains. J Vet Med Sci 54: 493 - 499.

31. Shane S. 1981. Causas y prevención de colisepticemia en parvadas de pollos de asar comerciales. Industria Avícola 12: 28 - 30.

32. Spears K. R., Wooley R. E., Brown J., Nolan L. K. 1992. Failure of the congo red dye uptake test to discriminate between virulent and avirulent avian *Escherichia coli*. Avian Dis 36: 1012 - 1014.

33. Sttebins K. E., Berkhoff H. A., Corbett W. T. 1992. Epidemiological studies of congo red *Escherichia coli* in broiler chickens. Can J Vet Res 56: 220 - 225.

34. Stugard C. E., Daskaleros P. A., Payne S. M. 1989. A 101 kilodalton heme-binding protein associated with congo red binding and virulence of *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains. Infect Immun 57: 3534 - 3539.

35. Toledo M. R. F., Trabulsi L. R. 1983. Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sereny test. J Clin Microbiol 17: 419 - 421.

36. White D. G., Wilson R. A., Emery D. A., Nagaraja K. V., Whittam T. S. 1993. Clonal diversity among strains of *Escherichia coli* incriminate in turkey colisepticemia. Vet Microbiol 34: 19 - 34.

37. Wooley R. E., Spears K. R., Brown J., Nolan L. K., Fletcher O. J. 1992. Relationship of complement resistance and selective virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. Avian Dis 36: 679 - 684.