



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

DETECCIÓN DE CEPAS DIARREOGÉNICAS DE *Escherichia coli* Y *Salmonella enterica* EN AVES DE TRASPATIO DE LA COMUNIDAD AGUA ESCONDIDA DEL MUNICIPIO DE ZENTLA, VERACRUZ.

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

ALBERTO MORALES DOMÍNGUEZ

TUTORA:

CECILIA ROSARIO CORTÉS

COMITÉ TUTORAL:

**MARÍA DEL PILAR CASTAÑEDA SERRANO
CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

DEDICATORIA

A DIOS. Por permitirme llegar hasta donde he podido, darme la fortaleza necesaria para vencer todos los obstáculos en mi camino, por estar junto a mí en los momentos más difíciles y por mostrarme que los errores que muchas veces cometemos, nos hacen crecer con gran fortaleza.

A MIS PADRES Y HERMANO. A mi amada familia, la cual ha estado conmigo siempre, en todo momento. Espero que Dios me dé la oportunidad de recompensarles algún día todo lo que han hecho por mí, son lo más preciado que tengo en esta vida. Les agradezco infinitamente su preocupación por mi educación, por todos los valores inculcados y los grandes momentos que hemos pasado juntos. Los amo.

A LA FAMILIA MORALES RODRÍGUEZ. Por abrirme las puertas de su hogar y adoptarme como un miembro más de ustedes durante una etapa muy complicada en el inicio de este proyecto. Eso es algo que siempre tendré presente y de lo cual estaré agradecido toda mi vida. Que Dios los bendiga.

A MIS TÍOS Y PRIMOS. Por todo el apoyo brindado en los momentos difíciles de mi vida y por ser una excelente compañía desde mi niñez. Los quiero a todos.

A LOS MVZ. MC. ALFREDO ARROYO LARA Y DORA LETICIA VÁZQUEZ COUTURIER. Les agradezco todo su apoyo brindado desde mi servicio social, por impulsarme en mi desarrollo profesional e involucrarme en el área avícola. Aprendí mucho de ustedes, son unas excelentes personas. Muchas gracias.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS. Gracias por todo el apoyo brindado durante la realización de mi trabajo y también por las atenciones que siempre tuvieron conmigo. Éxito a todos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por ser una gran institución muy generosa que abre sus puertas a todo aquel que busca superarse.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por darme la oportunidad de recibir la beca, con la cual pude cubrir los gastos de mi estancia y alimentación en la Maestría.

Al Departamento de Producción Animal: Aves. Por abrirme sus puertas y hacerme formar parte de un gran equipo de profesionales. Especialmente a la Dra. Cecilia Rosario Cortés por aceptar ser mi tutora y creer en mí. Gracias por tenerme paciencia y por todos sus conocimientos compartidos.

Al Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina. Al Dr. Armando Navarro Ocaña, por todas las facilidades otorgadas para la realización del trabajo de laboratorio, así como a Biol. Delia Licona Moreno, MC. Maritona Ramírez Pérez, Biol. José Luis Méndez Sánchez, Tec. Luis Antonio León Alamilla y Tec. Gabriel Pérez Soto (Torre de Investigación). En posgrado al MC Ulises Hernández Chiñas. Gracias a todos por su atención y sus conocimientos aportados para mi formación.

Al comité tutorial. Dra. María del Pilar Castañeda Serrano y Dr. Carlos Alberto Eslava Campos, Gracias por todo su apoyo y por su gran aportación en la realización y redacción de la tesis así como también haber transmitido parte de sus conocimientos.

A los miembros del jurado. Dra. Ina Marcela Figueroa Ochoa, Dra. Carmen Wachter Rodarte, Dr. Néstor Ledesma Martínez y Dr. Guillermo Valdivia Anda. Por enriquecer y mejorar la redacción de esta tesis con sus conocimientos y comentarios. Gracias.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), y al H. Ayuntamiento de Zentla. En especial al MC. Alfredo Arroyo Lara y a la Sra. Lucila Corona Bernardi, por facilitar el acceso a las comunidades donde se realizó el muestreo.

CONTENIDO

	1. Introducción	1
a.	<i>Salmonella</i>	3
b.	<i>Escherichia coli</i>	4
c.	EPEC	4
d.	ETEC	5
e.	EHEC	5
f.	EIEC	5
g.	EAEC	6
h.	Hipótesis	7
i.	Objetivo general	7
j.	Objetivos específicos	7
2.	Material y Métodos	8
a.	Lugar de estudio	8
b.	Tamaño de muestra	8
c.	Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	8
d.	Prueba de hibridación de ADN para <i>Salmonella</i>	9
e.	Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	9
f.	Identificación serológica	10
g.	Preparación e identificación del antígeno somático	10
h.	Preparación e identificación del antígeno flagelar	11
i.	Identificación del serotipo O157:H7	11
j.	Detección de genes de virulencia por PCR	12
3.	Resultados	14
a.	Aislamiento de <i>Salmonella</i>	14
b.	Aislamiento de <i>E. coli</i>	14
c.	Casa 1	14
d.	Casa 2	15
e.	Casa 3	15
f.	Identificación de O157:H7	15
g.	PCR para genes de virulencia	15
4.	Discusión	16
5.	Conclusión	20
6.	Referencias	21

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores utilizados en la prueba de PCR para la identificación de <i>E. coli</i> diarreogénica	24
Cuadro 2. Cepas utilizadas como controles en la prueba de PCR	25
Cuadro 3. Total de microorganismos identificados de las 290 colonias	26
Cuadro 4. Serogrupos más frecuentes de los 145 aislados por casa	27
Cuadro 5. Total de serotipos encontrados en todas las cepas y su ocurrencia en las aves	28
Cuadro 6. Serogrupos encontrados por casa asociados a patotipos diarreogénicos de <i>E. coli</i>	29

FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los controles para la prueba PCR

30

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Morales Domínguez Alberto. 2009.
“Detección de cepas diarreogénicas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* en aves de traspatio de la comunidad Agua escondida del municipio de Zentla, Veracruz”. Tutora: Dra. Cecilia Rosario Cortés.

Resumen

Las aves de traspatio (pollos y gallinas) forman parte de la alimentación y economía familiar en comunidades rurales y marginadas; sin embargo, éstos animales pueden estar relacionados en la transmisión de patógenos como *Escherichia coli* diarreogénica y *Salmonella* sp. que causan diarreas y afectan la salud de las personas; por tal motivo, se realizó un muestreo en 3 casas de una comunidad rural del municipio de Zentla; Veracruz, para detectar la presencia de estas dos bacterias. Para ello se obtuvieron 60 hisopos cloacales a partir de 30 aves, para el análisis de *E. coli* y *Salmonella*. En el primero, se obtuvieron 290 colonias, de las cuales se serotificaron 145 con suero de conejo para los grupos O:H y se analizaron 28 serotipos mediante un ensayo de PCR para los genes *eae*, *bfp*, *lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *ial* y pCVD432. De las 290 colonias, 92% fueron identificadas bioquímicamente como *E. coli*, el 8% restante fueron *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*. Los serogrupos más comunes de *E. coli* fueron OND (18.6%), O8 (12.4%), O178 (7.5%) y O7 (6.8%). Los serotipos analizados por PCR, no mostraron amplificación para los genes de virulencia antes mencionados. No se detectó *Salmonella* en ninguna muestra según el procedimiento de la NOM-005-ZOO-1993, lo cual se corroboró con un ensayo de hibridación de ADN. Estos resultados indican la presencia de serogrupos asociados con *E. coli* diarreogénica, por lo que estas aves podrían participar como fuentes de infección para las personas que habitan en la comunidad Agua escondida.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Salmonella*, serotipificación, traspatio, diarrea, marginación.

Abstract

Broilers and hens are included as part of the diet and economic activity in the backyard livestock production; however, these species have been associated to the transmission of foodborne pathogens such as *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. that cause diarrhea and affect people health; for this reason, sixty cloacal swabs were obtained from 30 birds in three houses in Zentla; a rural community of Veracruz, in order to detect *E. coli* and *Salmonella*. 290 strains were obtained, 145 were serotyped, and 28 serotypes analyzed by PCR for *eae*, *bfp*, *lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *ial* genes and pCVD432. 290 colonies were biochemically identified as *E. coli*, the remaining 8% were *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas*. The most common serotypes of *E. coli* were OND (18.6%), O8 (12.4%), O178 (7.5%) y O7 (6.8%). All serotypes were negative for the genes described above using PCR technique. *Salmonella* was not find in any sample according the procedure describe by NOM-005-ZOO-1993, and confirmed with a DNA hybridization assay. Results of this study indicate the presence of some serogroups associated with *E. coli* diarrheagenic, so these birds could be involved as sources of infection for people living in the community Agua escondida from Zentla, Veracruz.

Key words: *Escherichia coli*, *Salmonella*, serotyping, backyard, diarrhea, marginalization.

INTRODUCCIÓN

A pesar de que en México la marginación se ha reducido los últimos años, aún existen Estados con este problema como Veracruz ¹, el cual ocupa el cuarto lugar en el territorio nacional. En dicho Estado, el municipio de Zentla está entre los más marginados, ya que su porcentaje de población con ingresos de hasta dos salarios mínimos es de 76.81%; viviendas sin drenaje ni servicio sanitario, 23.73%; viviendas con piso de tierra, 23.40% y en la república ocupa el lugar 934 de los 2443 municipios existentes ^{1,2}. Estos datos sugieren que los recursos básicos y condiciones de vida de las personas de este municipio son deficientes. Aunado a esto, la carencia de servicios de salud adecuados y los malos hábitos de higiene que existen en este tipo de comunidades, reducen la calidad de vida de los habitantes de dichas zonas.

El traspatio forma parte integral de las unidades de producción familiar en muchas regiones del país, en éste se realizan diversas actividades encaminadas a la producción de animales y vegetales en pequeña escala ³. Entre los animales que se crían se encuentran bovinos, cerdos, borregos y aves; las gallinas y los pollos (*Gallus gallus*) están entre los más comunes ⁴; principalmente, porque requieren de un manejo relativamente sencillo y los productos que se obtienen, como huevo y carne, son de alta calidad nutritiva y de bajo costo ⁵. Este tipo de producción ganadera en pequeña escala ³ se realiza principalmente en comunidades rurales y marginadas donde muchas familias carecen de recursos suficientes que les ayuden a cubrir sus necesidades económicas y nutricionales.

Para subsanar en cierta medida las carencias de los grupos marginados, a partir del año 2004, en algunas comunidades rurales del Estado de Veracruz, se lleva a cabo un programa por parte del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), denominado “Evaluación de la progenie de gallinas Rhode Island cruzadas con gallos criollos para su introducción al traspatio”; el cual ha sido dirigido a instituciones de gobierno como el DIF (Desarrollo Integral de la

Familia) y los departamentos de fomento agropecuario en distintos ayuntamientos; en él se ofrecen paquetes de aves (en su mayoría hembras) a los habitantes de las comunidades rurales, con el objetivo de que las mismas familias produzcan alimento, como huevo y carne, a un bajo costo y que cubra parte de sus requerimientos nutricionales. Sin embargo, es común observar en las comunidades rurales animales que circulan y duermen dentro de las casas, lo que puede incrementar la transmisión de microorganismos patógenos al humano debido a la estrecha relación que existe entre ellos; por ejemplo, Braden (2006) ⁶, menciona que se han aislado serotipos de *Salmonella* en Estados Unidos a partir de diversos animales como insectos, roedores y aves silvestres, los cuales convivían con las gallinas de algunas casas. Por otro lado, debido a que los animales entran a los hogares y en ocasiones defecan dentro de ellos, aumenta el peligro de contagio hacia las personas, sobre todo si son viviendas con piso de tierra ya que hay más polvo en el ambiente, por lo tanto, existe más riesgo de que se presente una infección intestinal como lo indica un estudio realizado en Londres por Rogers (1951) ⁷ donde se comprobó que cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* se pueden aislar a partir del polvo y aerosoles.

La diarrea se puede definir como una alteración en el movimiento normal del intestino caracterizado por un incremento en el contenido líquido, volumen o frecuencia de las evacuaciones (mayor o igual a 3 en un período de 24 horas) ⁸. En el mundo se estima que el número de muertes por diarrea asciende a 4 millones de personas por año ⁹, por lo que se encuentra entre los primeros lugares de enfermedad en todas las edades ¹⁰. En el año 2003, en México fallecieron 470 330 personas, de las cuales el 1% se debió a infecciones intestinales ¹¹. En el Estado de Veracruz se registran un promedio de 350 mil casos nuevos de enfermedades diarreicas anuales, de ellos, el 18% corresponde a niños menores de 5 años ¹⁰. Por largo tiempo se ha considerado que las aves pueden ser reservorios de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* (cepas diarreogénicas) ^{12,13,14,15}, las cuales se consideran causantes de diarrea en el humano; en un estudio realizado en Bangladesh por Biswas *et al*,

(2008) ¹⁶ en pollos de traspatio se encontró que la colibacilosis y la salmonelosis fueron dos de las principales causas de mortalidad en estas aves.

Salmonella es un bacilo gram negativo, intracelular facultativo y se clasifica de acuerdo a sus características bioquímicas generales en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Las salmonelas de mayor importancia médica pertenecen a las subespecies *enterica* y *arizonae*. Según el esquema clásico de Kauffman-White basado en antígenos somáticos, flagelares y ocasionalmente capsulares (Vi), esta bacteria se divide en más de 2,500 serotipos, que pueden ser móviles o inmóviles ¹⁷.

Las infecciones por *Salmonella* pueden causar desde una infección gastrointestinal moderada (paratifoidea) ocasionada principalmente por *S. Paratyphi*, hasta una infección sistémica que compromete la vida del paciente (tifoidea) causada por *S. Typhi*, ambas bacterias colonizan únicamente al humano; de igual manera hay salmonelas que colonizan sólo a aves como *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. Sin embargo, existen otras asociadas al consumo de alimentos de origen animal contaminados, con carácter zoonótico como *Salmonella* Enteritidis (SE). Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que las variedades mayormente involucradas en diarreas son SE, *S. Typhimurium* y *S. Heidelberg* y que el 96% de los casos de salmonelosis se relacionan con el consumo de alimentos mal cocinados ¹⁸. En México, durante 1998 se notificaron 215,155 casos de salmonelosis; los estados más afectados fueron Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo ^{19,20}. Gutiérrez-Cogco *et al* (2000) ¹⁹ llevaron a cabo un estudio en el cual analizaron 24,394 cepas de *Salmonella* aisladas de diversas fuentes por laboratorios de salud pública y privados de México entre 1972 y 1999 e identificaron 199 serotipos, el más frecuente fue *S. Typhimurium* y en segundo lugar SE. En años más recientes, Vázquez *et al* ²¹ (2004), señala que la Secretaría de Salud en México se reportan anualmente un promedio de 68,000 casos de infecciones causadas por bacterias del género *Salmonella* ²¹. Por otro parte, el Center of Diseases Control (CDC), la OMS,

Health Canadá y la Unión Europea encontraron que el consumo de huevo crudo es el que se asocia cada vez con mayor frecuencia a los casos de salmonelosis en humanos

18

Por otro lado, *Escherichia coli* es el bacilo gram negativo y anaerobio facultativo predominante de la biota del colon; la mayoría de las cepas fermentan la lactosa y son móviles. Típicamente coloniza el tracto intestinal del infante dentro de las primeras horas de vida y poco después obtienen beneficios mutuos ²². Usualmente, *E. coli* está confinada al lumen intestinal; sin embargo, en huéspedes inmunodeprimidos o cuando las barreras gastrointestinales son atravesadas, incluso las cepas no patógenas pueden causar infecciones. En humanos, las cepas patógenas pueden ocasionar tres síndromes clínicos generales: infección del tracto urinario, sepsis/meningitis y enfermedad diarreica ²³.

Esta última es causada por distintos grupos patógenos como enteropatógenas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC) y enteroagregativas (EAEC). Cada uno de ellos, posee factores de virulencia particulares y ocasiona síndromes clínicos de diferente severidad ^{22,23}.

El grupo EPEC se ha relacionado fuertemente a diarreas en niños (0-6 meses de edad) de países en desarrollo. Su transmisión es fecal-oral, por alimentos, biberones contaminados o fomites que sirven como vehículos. Las manifestaciones clínicas comunes son diarrea aguda, vómito y fiebre leve ²³. A pesar de que la principal ruta de infección es humano-humano, Kariuki *et al* (2002) ²⁴ mencionan que aves clínicamente sanas pueden ser reservorios de cepas enteropatógenas; de hecho, en Alemania, Krause *et al* (2005) ²⁵ identificaron en cepas de aves, ovejas, bovinos, perros y gatos la presencia del gen *eae* (el cual es un gen de virulencia característico de cepas EPEC) que codifica para la intimina; mientras que en México, Rosario *et al* (2004) ²⁶ encontraron la presencia del gen *eae* en cepas de *E. coli* aisladas de pollos de engorda de granjas comerciales.

Por otro lado, las cepas ETEC están asociadas con dos síndromes clínicos: diarrea posdestete en niños que habitan países en vías de desarrollo y la diarrea del viajero. Estas cepas se caracterizan por elaborar 2 toxinas, una termolábil (LT) y otra termoestable (ST), que ocasionan manifestaciones clínicas como diarrea aguda acuosa usualmente sin sangre, moco o exudado purulento; la fiebre y el vómito están presentes en una minoría de los pacientes. A pesar de que investigaciones epidemiológicas muestran que el agua y alimentos contaminados son las principales vías de transmisión ^{27,28}, se ha logrado aislar también serogrupos asociados al patotipo ETEC de aves enfermas y aparentemente sanas ²⁴.

El grupo EHEC elabora una toxina parecida a la de *Shigella* (Shiga-like toxin). Entre los signos clínicos más importantes en humanos que causa este grupo, están la presencia de diarrea con o sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito, síndrome urémico hemolítico, y colitis hemorrágica, aunque también se pueden presentar complicaciones como perforación del colon, prolapso rectal, apendicitis, cistitis hemorrágica, hepatitis, edema pulmonar, disfunción en el miocardio, entre otros ²³. En países desarrollados, las cepas EHEC se han asociado a la transmisión zoonótica, ya que coloniza el tracto digestivo de varios animales, principalmente el ganado bovino, que es el reservorio más importante, a diferencia de las aves en las que la prevalencia de este serotipo se ha considerado baja ²⁹.

Las cepas EIEC están relacionadas con *Shigella* spp y se estima que son responsables de 150 millones de casos y 1 millón de muertes al año en países en desarrollo ³⁰. En algunos brotes, el agua y comida contaminadas han sido la fuente de infección ³¹, aunque la transmisión persona-persona puede ocurrir ³². La manifestación clínica más importante es la diarrea acuosa con moco y sangre, mientras que una minoría de pacientes puede llegar a presentar el síndrome de disentería ²⁴. En un estudio realizado por Rosario *et al* (2004) ²⁷ se reportó una amplia distribución del gen *ipaH* (72%) a partir de diversas muestras de aves provenientes de una empresa avícola en México.

Las cepas EAEC se han asociado al síndrome de diarrea persistente (más de 13 días) y es una causa de morbilidad importante en pacientes inmunodeprimidos, pero sobre todo, en recién nacidos y niños menores de dos años. Los síntomas clínicos son diarrea líquida persistente, verde con moco y sin sangre. En México, este grupo ha sido considerado como la principal causa de diarrea esporádica³³.

Debido a las condiciones precarias que predominan en traspatios de zonas marginadas como la comunidad rural de Agua escondida en el Estado de Veracruz, las aves domésticas (pollos y gallinas) pueden ser transmisoras de algunos microorganismos patógenos para el humano. Por ello, se considera importante conocer si las aves criadas bajo condiciones de traspatio pueden ser reservorios de bacterias como *Salmonella enterica* y cepas diarreogénicas de *E. coli*, lo que podría sugerir su participación como causa de diarrea en comunidades rurales, lo que afecta la calidad de vida de sus habitantes.

Hipótesis

Las aves domésticas que forman parte de los paquetes que entregan los ayuntamientos municipales y que son criadas bajo condiciones de traspatio en la comunidad Agua escondida del municipio de Zentla, Veracruz, son portadoras de cepas diarreogénicas de *E. coli* y *Salmonella enterica*.

Objetivo general

Conocer si las aves que forman parte de los paquetes de apoyo familiares y que son criadas en la comunidad de Agua escondida del municipio de Zentla, Veracruz, están colonizadas por cepas diarreogénicas de *E. coli* y *Salmonella enterica*, lo que pudiera explicar su participación como fuentes de infección para el humano.

Objetivos específicos

Determinar la presencia de *E. coli* y *Salmonella* mediante hisopos cloacales tomados a de aves de traspatio en la comunidad Agua escondida.

Identificar bioquímicamente las colonias aisladas.

Identificar los serotipos de las cepas de *E. coli* identificadas.

Determinar la presencia de genes de virulencia relacionados con los grupos diarreogénicos de *E. coli* mediante PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El muestreo se realizó en la comunidad Agua escondida que pertenece al municipio de Zentla, Veracruz; cuenta con 634 habitantes y está ubicada en la zona centro del estado, a una altura de 800 msnm, con un clima semi-cálido y una temperatura promedio de 26°C. El presente estudio se realizó en casas de esta comunidad beneficiadas con el programa de otorgamiento de paquetes familiares consistentes en aves.

Tamaño de muestra

Para obtener el tamaño de muestra se llevó a cabo un análisis de muestreo aleatorio simple con el software EPIDAT 3.1 y con un nivel de confianza de 95%. Se seleccionaron 3 casas y en cada una se obtuvieron muestras a partir de 10 aves (n=30) y se recolectaron 2 hisopos cloacales por cada ave; uno para el aislamiento de *E. coli* y otro para *Salmonella*.

Aislamiento e identificación de *Salmonella*

Los hisopos se colocaron en tubos con medio de transporte Stuart y se mantuvieron en refrigeración hasta su llegada al laboratorio del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: Aves), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. De acuerdo con lo establecido en la norma NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar, los hisopos fueron depositados en tubos con caldo selenito (CS) e incubados durante 18 h a 37°C. Pasado ese tiempo, se realizó la siembra en cajas con agar MacConkey (McC) y verde brillante, se incubaron durante 24 h a 37°C y se inspeccionaron las colonias para determinar su morfología. Adicionalmente, se sembraron los hisopos a las 48 y 72 h en los mismos medios. Las colonias lactosa negativas sospechosas fueron aisladas en cultivo puro y posteriormente identificadas mediante las pruebas bioquímicas agar de hierro y triple azúcar (TSI), agar lisina

hierro (LIA), medio para detectar ácido sulfhídrico, indol y motilidad (SIM), urea y citrato de Simmon's, para corroborar su identidad.

Prueba de hibridación del ADN para *Salmonella*. Las 30 muestras del CS se analizaron con una prueba de hibridación de ADN (GENE-TRAK *Salmonella* Assay de Neogen Corporation) de acuerdo a lo recomendado por el fabricante. Brevemente, se transfirió 1mL de muestra de CS a 10 mL de medio Revival *Salmonella* (RS) y se incubaron por 24 h a 35°C, nuevamente se tomó 1 mL de los tubos con RS y se pasaron a otros con CS y caldo tetrionato (CT), se incubaron de 16 a 18 h a 35°C. Posteriormente, se volvió a tomar 1mL de CS y CT, se depositaron en tubos con caldo para gram negativos (GN) y se incubaron durante 12 a 18 h a 35°C. A partir del crecimiento de GN se tomaron 0.5 mL, se colocaron en tubos de 12 x 75 mm rotulados con el número de muestra y se les añadió 0.1mL de una solución de lisis (proteínasa K); a continuación, se incubaron por 5 min a temperatura ambiente (TA), para después colocarse en baño María a 65°C, y agregar 0.2 mL de las sondas de ADN. A cada tubo se le colocaron unas tiras reactivas de poliestireno y se dejaron incubar por 1 h. Posteriormente, se retiraron las tiras y se depositaron en otro juego de tubos que contenían enzima conjugada, se incubaron por 20 min a temperatura ambiente, después se enjuagaron y se depositaron en tubos con substrato cromogénico durante 20 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se descartaron las tiras, se agregó a cada tubo una solución detenedora; y los tubos se colocaron en un fotómetro para medir la absorbancia. Un resultado negativo a hibridación fue aquel con un valor menor o igual a 0.10 de absorbancia y uno positivo mayor a 0.10.

Aislamiento e identificación de *E. coli*

Los hisopos cloacales se colocaron en tubos con medio Stuart en refrigeración para su traslado. Una vez en el laboratorio, los hisopos fueron colocados de manera individual en tubos con agua peptonada y se incubaron por 24 h a 37°C, después de lo cual se sembraron en cajas con agar McC y se incubaron durante 24 h a 37°C.

Posteriormente, se revisó el crecimiento y se seleccionaron 10 colonias por cada muestra, tanto lactosa positivas como negativas, las cuales fueron aisladas en cultivo puro en McC para posteriormente ser identificadas mediante pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, urea, citrato de Simmon's). Las cepas aisladas de *E. coli* se sembraron en gelosa especial como copias de trabajo y en Dorset para su almacenamiento. Se realizó una prueba de X^2 para conocer si las diferencias entre frecuencias de aislamientos de *E. coli* con *Aeromonas* sp. fueron significativas.

Identificación serológica. Las cepas identificadas como *E. coli* se tipificaron con sueros de conejo (SERUNAM), preparados contra los 185 antígenos somáticos y 56 flagelares mediante la técnica empleada en el Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM referida por Orskov y Orskov⁵⁷, para lo cual se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo redondo.

Preparación e identificación del antígeno somático. Las cepas se sembraron individualmente en tubos con 10 mL de TSA (pH de 7.2), los cuales se incubaron por 24 h a 37°C, posteriormente, se cosechó el crecimiento bacteriano en 10 mL de solución salina 0.15 M; la suspensión obtenida se transfirió a otro tubo y se inactivó por esterilización a vapor fluente a 100°C durante 1 h. Después de ello, se añadió a cada tubo solución salina con formaldehído al 0.6 % (v/v). Por último, los tubos fueron sellados con parafilm y almacenados para ser usados como antígeno somático.

Las microplacas se prepararon colocando en cada pozo 50µl de suero monovalente con un dispensador Quick Spense Controller Model 96-200 DYNATECH LABORATORIES. Una vez llenas las microplacas, se colocaron 50µl del antígeno somático previamente preparado. Las placas se envolvieron con papel adherente para evitar la evaporación y se incubaron a 50°C por 24 h. Después de lo cual, las placas fueron revisadas para determinar la reacción de aglutinación. A continuación, se identificaron los sueros que reconocían el antígeno bacteriano y se hicieron diluciones de estos desde 1:100 hasta 1:12800. Se utilizaron sueros absorbidos y

diluidos 1:50, cuando hubo reacciones cruzadas. Para definir el serogrupo de una cepa se identificó el mayor grado de aglutinación en la dilución más alta del suero comparada con la que se presenta con el antígeno homólogo. Las cepas que no aglutinaron con ningún antisuero del esquema y mostraban el fondo del pozo turbio, fueron designadas como OND (No Determinadas).

Preparación e identificación del antígeno flagelar. Para la determinación del antígeno H, las cepas se sembraron por picadura en el medio semisólido Colindale (peptona de caseína 10g, extracto de carne 3g, gelatina bacteriológica 80g, NaCl 5g, agar agar 4g, agua destilada 1000 mL, pH 6.9) en el interior del tubo de Craigie y se incubaron a 25°C hasta que se observara un enturbiamiento del medio de cultivo. Se consideró a un cultivo como móvil, cuando hubo crecimiento dentro y fuera del tubo de Craigie. Aquellas cepas en las que no se observó turbidez se consideraron no móviles (NM). De los tubos que presentaron movilidad se tomó una muestra con asa bacteriológica y se sembró en 10 mL de caldo peptona de biotriptasa al 2% (pH 7.2), se incubaron a 30°C por 24 h y por último fueron inactivados con solución salina con formalina al 0.6% (SSF).

Para identificar el antígeno flagelar se realizó un procedimiento similar al descrito para el antígeno somático, solamente varió el tiempo de la incubación de las placas, que fue de 2 h a 50°C.

Identificación del serotipo O157:H7. Se utilizó un dispositivo de inmunocaptura (Reveal *E. coli* O157:H7 Test System) para determinar la presencia de cepas *Escherichia coli* serotipo O157:H7 del grupo EHEC. El procedimiento se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, del agua peptonada en la que fueron incubados los 30 hisopos originales para *E. coli*, se tomó 1 mL que se transfirió a tubos con caldo infusión cerebro corazón el cual se incubó a 37°C por 18 h. De este cultivo se depositaron 5 gotas en un dispositivo, en el cual la muestra se difundió hacia una zona de reacción que contiene anticuerpos anti-*E. coli* O157 conjugados con partículas de oro coloidal que deben unirse al antígeno, si éste

se encuentra presente en la muestra. Estos complejos de antígeno-anticuerpo se difunden a través de una membrana de celulosa que contiene una zona de anticuerpos anti-*E. coli* O157. El complejo inmune con oro conjugado forma agregados en esta zona hasta crear una línea visible. El resto de la muestra continúa su migración hacia el resto de la membrana. La revisión de los dispositivos se hizo 20 min después de la inoculación. Un resultado negativo fue aquel en el que se visualizó una banda en la zona C (control) y no en la zona T (test); uno positivo, cuando se observa la formación de ambas bandas. En los casos en los que no apareció la banda C, la prueba se consideró inválida y se repitió nuevamente.

Detección de genes de virulencia por PCR. Se analizaron un total de 28 cepas, las cuales se escogieron con base a su relación con los serogrupos de *E. coli* diarreogénicos reportados con mayor frecuencia. Para determinar la presencia de genes de virulencia de las cepas de *E. coli* aisladas en el presente estudio se utilizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa descrita por López-Saucedo *et al*⁴⁰ modificada. La mezcla total de PCR fue de 25µL, 1 µL de MgCl₂, 2 µL de dNTP's, 0.1 µL de Taq polimerasa, 1.75 µL de iniciadores, 13.9µL de agua bidestilada y 2µL de templado. Para extraer el ADN de las muestras se tomó una asada de cada colonia y se depositó en microtubos que contenían 90 µL de TE 1x (10mM Tris HCL y 1mM EDTA, pH-8) con 10 µL de proteinasa K (14mg), durante 2 h se calentó esa mezcla a 56°C y después se introdujeron los tubos en agua hirviendo por 10 minutos. Los iniciadores utilizados se muestran en el **cuadro 1**. Se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones para los genes *eae*, *bfp*, *st*, *lt*, *ial*, *stx1* y *stx2*: 94°C (5 min, 1 ciclo); 50°C (2 min, 1ciclo); 72°C (45 seg), 94°C (45 seg) y 50°C (45 seg), 30 ciclos y una extensión final 72°C (10min). En el caso del plásmido pCVD432 las condiciones fueron: 94°C (5 min, 1 ciclo), 94°C (00:40 seg), 53°C (1min), 72°C (1min) por 30 ciclos y 72°C (10 min). Los productos obtenidos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa (2%) TAE (Tris-Ácido acético-EDTA) a 96mVolts. El gel fue teñido con bromuro de etidio y visto en un transiluminador de rayos UV. Las cepas usadas como

controles positivos y negativos fueron proporcionadas por el departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México **(cuadro 2)**.

RESULTADOS

De acuerdo con los procedimientos establecidos por la NOM-005-ZOO-1993 Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar, se analizaron las 30 muestras de aves, el resultado obtenido reportó ausencia de *Salmonella* en todas ellas, este resultado fue confirmado con la prueba de hibridación de ADN.

Con respecto a la identificación de otras enterobacterias, se observó una gran diversidad de microorganismos, únicamente la muestra número 7 (de la casa 1) no mostró crecimiento bacteriano. De las 29 muestras restantes se seleccionaron 290 colonias, de ellas, 267 (92.06 %) fueron identificadas como *E. coli*, el resto (n=23) correspondió a los géneros *Aeromonas* sp. (n=16), *Klebsiella* sp. (n=4), y *Enterobacter* sp. (n=3). De todos estos, sólo *E. coli* y *Aeromonas* sp. se encontraron en las todas las casas estudiadas. Al analizar la frecuencia de aislamiento de ambos microorganismos con una prueba X^2 , se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) al comparar el número de aislamientos de *E. coli* contra los de *Aeromonas* sp. (**cuadro 3**).

La tipificación de *E. coli* se realizó a 5 colonias seleccionadas al azar (n=145), el resultado obtenido mostró 32 antígenos somáticos y 25 flagelares diferentes, el análisis del conjunto reportó 74 serotipos. Entre los serogrupos, el OND (no determinado con los 185 sueros anti O) fue el más común en las 145 cepas (18.6%) seguido por los serogrupos O8 (12.4%), O178 (7.5%), O7 (6.8%) y O44 (4.1%). El análisis de la fórmula antigénica completa (O:H) mostró que O8:H11 fue el serotipo más común presente en todas las aves (**cuadros 4 y 5**).

Al realizar el análisis por casa de los diferentes serogrupos identificados se observó que en la casa uno hubo 17 diferentes, en la dos 12 y en la tres 15. El serogrupo más común en las casas uno y tres correspondió al OND (16% y 32% respectivamente), con relación a la casa dos, O8 fue el identificado con mayor

frecuencia (20%). Una observación interesante fue el hecho de que dos de las aves de la casa uno estaban colonizadas (las cinco colonias mostraron el mismo serotipo) por cepas de los serotipos O181:H49 una de ellas y O44:H45 la otra. Así mismo, resultó relevante que en la misma casa 16 de los 17 serogrupos identificados corresponden a los grupos diarreogénicos EPEC (n=4), ETEC (n=6), EHEC (n=1), EAEC (n=3) y EIEC (n=2). Por otro lado, en la casa 2 el serotipo O51:H11 se identificó en las 5 cepas de una de las aves y de los 12 serogrupos encontrados, 4 de ellos corresponden a los grupos ETEC (n=2), EHEC (n=1) y EAEC (n=1). Con relación a la casa 3, de los 15 serogrupos identificados, 9 pertenecen a los grupos diarreogénicos EPEC (n=3), ETEC (n=3), EIEC (n=1) y EAEC (n=2). Cabe destacar que serogrupos pertenecientes a los patotipos ETEC y EAEC estuvieron presentes en las tres casas (**Cuadro 6**). El ensayo de inmunocaptura para el aislamiento de *E. coli* O157, corroboró los resultados obtenidos por el método tradicional de caracterización por sueros específicos, que mostraron la ausencia de este serogrupo en las cepas estudiadas.

La búsqueda de genes de virulencia (*eae*, *bfp*, *lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *ial* y el plásmido pCVD432) por ensayo de PCR, fue negativo para las cepas seleccionadas que incluían 28 serogrupos relacionados a tipos diarreogénicos de *E. coli* (**Figura 1**).

DISCUSIÓN

Existen pocos estudios relacionados con el impacto que pueden tener las aves de traspatio (cuya producción se realiza bajo condiciones precarias), sobre la salud de los humanos. Por tal motivo, diferentes autores coinciden en la importancia de integrar grupos de trabajo multidisciplinarios, que contribuyan a mejorar las condiciones en las que se lleva a cabo este tipo de producción ^{3,5}.

En este estudio se encontró una frecuencia de aislamiento de *E. coli* de 92%, en un trabajo previo (2006) ³⁴ en la misma comunidad de Agua escondida, Zentla, la frecuencia de aislamiento de la misma bacteria fue del 67%. La diferencia observada entre ambos estudios posiblemente esté relacionada con la época del año en que se realizaron ambos muestreos, ya que el primer estudio (2006) se realizó en otoño (octubre) y el presente en primavera (abril). Es bien conocido que aunque *E. coli* se puede aislar en cualquier época del año su frecuencia de aislamiento se incrementa en el periodo primavera verano (Guzmán, 2008) ³⁵.

Barnes *et al.* (2003) ³⁶ refieren que entre el 10 y 15% de los aislados de *E. coli* obtenidos de muestras de intestino de pollos sanos pertenecen a serotipos potencialmente patógenos. En un estudio más reciente, Krause *et al.* (2005) ³⁷, mencionan que las mascotas y los animales domésticos constituyen un importante reservorio natural de este tipo de cepas, que además pueden ser portadoras de genes de virulencia. En nuestro estudio se identificaron cepas de *E. coli* de los serogrupos O117, O8, O44 y O159 que corresponden a los tipos diarreogénicos EHEC, ETEC, EPEC, EAEC y EIEC de humanos. Este resultado confirma lo reportado previamente y señala la importancia de un manejo adecuado de las aves en traspatio, ya que pueden ser la fuente de infección para los humanos en la comunidad estudiada.

En un estudio realizado por Blanco *et al* (1998) ²⁵, reportan que a partir de 458 pollos con septicemia se identificaron 62 diferentes serogrupos de *E. coli*, 18 de

ellos (O1, O2, O5, O8, O12, O14, O15, O18, O20, O53, O78, O81, O83, O102, O103, O115, O116 y O132) tuvieron una frecuencia alta. En otro estudio realizado por Rosario *et al* (2004) ²⁷, se aislaron cepas de *E. coli* de los serogrupos O2, O8 y O15 en muestras de huevos fértiles e infértiles y en pollos con infección del saco vitelino. En el presente estudio, cinco de los serogrupos identificados (O2, O8, O15 y O20) coinciden con algunos de los reportados por Blanco *et al.* y Rosario *et al.* Tal observación sugiere que dichos serogrupos son comunes entre las aves y que existe una transmisión horizontal de los mismos; sin embargo, de éstos, O2 es considerado como patógeno para aves, por lo que al igual que en el caso de las cepas patógenas para humanos, las aves estudiadas pudieran ser transmisoras de estos microorganismos y ocasionar problemas de salud entre ellas, por lo que se sugiere que se realice vigilancia epidemiológica para evitar la aparición de brotes de diarrea en humano y enfermedades en aves. Los serogrupos O8, O44 y O7 aislados con una frecuencia alta en este estudio son integrantes de los patotipos ETEC, EPEC, y EAEC, esta observación coincide con lo reportado por Kariuki *et al.* (2002) ³⁸ y Paniagua *et al* (2007) ³⁹, quienes analizando muestras de diferentes especies animales y de humanos identificaron cepas de los mismos serogrupos. Estas observaciones plantean la pregunta sobre quién es el vehículo transmisor de estas bacterias, el humano o los animales. Sin embargo, lo que queda claro es que en este estudio las aves son reservorios de serotipos asociados a grupos diarreogénicos para humanos; por otro lado, esto permite proponer un estudio sobre la incidencia de diarreas en la comunidad y la etiología de las mismas. Dependiendo de los resultados que se obtengan, se podrá definir la participación de las aves de traspatio en la transmisión de los patógenos y la importancia de ejercer un control más estricto para su manejo. En este estudio, los ensayos de PCR para identificar la presencia de genes de virulencia relacionados con la patogénesis de la diarrea no reportaron amplificación de ninguno de ellos, lo que sugiere que estas cepas a pesar de estar relacionadas con serotipos patógenos para humanos, no siempre poseen los genes que les confieren dicha virulencia. El no haber encontrado genes relacionados con la virulencia en las cepas de aves pudiera estar relacionado con el hecho de que no son indispensables

para su supervivencia en este hospedero. Sin embargo, la transferencia horizontal de genes es un punto de gran relevancia, por tal motivo no se puede descartar que las aves que cohabitan con el humano puedan ser colonizadas por cepas que adquieran genes de virulencia de manera horizontal y representar un riesgo para el humano.

El grupo EPEC está compuesto por cepas típicas y atípicas, las primeras se encuentran principalmente en humanos y las segundas, en animales ⁴⁰. Se sabe que la característica principal de las atípicas es que no poseen el plásmido EAF ni el gen *eae*. En el presente estudio se encontraron los serogrupos O142 y O158, los cuales están incluidos dentro del grupo EPEC ⁴⁰; debido a que no presentaron los genes de virulencia de la bacteria, se pueden considerar que estas cepas son EPEC atípicas.

En un estudio, realizado por Blanco *et al*, (1998) ²⁵ se llevó a cabo un muestreo durante un año para identificar los serogrupos de *E. coli* aislados de aves con y sin septicemia (458 aislados) y aves sanas (167 aislados) y se encontró una proporción de 0.2% de O157 en aves septicémicas y 1.1% en aves sanas. Por otro lado, en Estados Unidos durante el año 2007, Doane *et al*. ⁴¹, encontraron una baja ocurrencia del serotipo O157:H7 de *E. coli* en granjas de pollos. En México no existen reportes que muestren la importancia clínica y epidemiológica de *E. coli* O157; hasta el momento se desconoce qué factores influyen en la baja frecuencia de aislamiento de la bacteria. Estudios realizados por Navarro *et al* (2005) ⁴², muestran la presencia de anticuerpos anti O157 en 15% y 20%, de una muestra de sueros de humanos y bovinos respectivamente, por lo que sugieren que estos anticuerpos evitan que los bovinos sean colonizados por este grupo de bacterias. Contrario a lo reportado en otros lugares del mundo, en nuestro estudio los resultados sobre el aislamiento de *E. coli* O157 fueron negativos, lo que confirma que esta bacteria no es común en nuestro país.

Un estudio realizado en Estados Unidos por Braden *et al.* (2006) ⁶, se menciona que se han aislado serotipos de *Salmonella* en diversos animales como insectos, roedores y aves silvestres que están en estrecha convivencia con las aves domésticas; así como también se han recuperado salmonelas de heces fecales de pollos y materia orgánica proveniente de las casetas; esto indica la importancia del ambiente en la transmisión de microorganismos y sugiere que *Salmonella* en un ambiente como el de las comunidades rurales, puede estar vinculada fuertemente con la diversidad animal en algunos lugares. No obstante y a pesar de las condiciones existentes en las comunidades rurales, en el presente estudio no se identificó la presencia del género *Salmonella* en ninguna de las muestras analizadas. Esto pudiera estar relacionado con el diseño del estudio en el que sólo se analizaron muestras de cloaca obtenidas con hisopos y no de otros sitios como nidos, pisos o gallineros. Por lo que se sugiere que en futuros estudios se amplíen los sitios de muestreo en las comunidades marginadas.

Para este estudio no se contempló el análisis de otras bacterias diferentes a *E. coli* y *Salmonella*; sin embargo, la presencia de *Aeromonas* en los aislamientos realizados es importante, ya que se ha demostrado que este género es también causante de problemas diarreicos e infecciones respiratorias en México ⁴³.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las aves de traspatio analizadas son portadoras de serogrupos que han sido relacionados a patotipos diarreogénicos de *E. coli* para humanos y de algunos serogrupos patógenos para aves. A pesar de que no se logró detectar la presencia de genes de virulencia en los serotipos asociados a las cepas patógenas de *E. coli*, no se descarta que estas bacterias puedan ser, en algún momento, un riesgo para la salud de las personas debido a la transferencia horizontal que existe entre los microorganismos en el intestino. Por este motivo se sugiere realizar pruebas complementarias para determinar la presencia de cepas virulentas en aves de traspatio, ya que en este estudio la identificación serológica no fue suficiente para la determinación de la virulencia en las cepas aisladas.

Referencias

1. Consejo Nacional De Población. CONAPO. Índices de marginación 2005. 1ed.
2. http://www.cdi.gob.mx/index.php?id_seccion=399
3. Aquino RE, Arroyo LA, Torres HG, Riesta DD, Gallardo LF, López YB. El guajolote criollo y la ganadería familiar en la zona centro del estado de Veracruz. *Téc Pecu Méx* 2003; 41 (2):165-173.
4. SAGARPA. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria PESA. Producción y manejo de aves de traspatio 2007.
5. Centeno BSB, López DCA, Juárez EMA. Producción avícola familiar en una comunidad del municipio de Ixtacamaxtlán, Puebla. *Téc Pecu Méx* 2007; 45 (1):41-60
6. Braden RC. Salmonella enterica Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States. *Food Safety* 2006; 43: 512-517.
7. Rogers KB. The spread of infantile gastroenteritis in a cubicle ward. *J Hyg* 1951; 49:140-151.
8. Boletín de práctica médica efectiva. Efectividad clínica en la enfermedad diarreica aguda-edad pediátrica. Instituto Nacional de Salud Pública 2006.
9. Sagaró E. Diarrea persistente. *Colomb Med* 2007; 38 (1): 66-70.
10. SESVER-SSA, Boletín epidemiológico 2006; sem 7.
11. Paniagua CGL, Monroy PE, Vaca PS. PCR, Manual de identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en material fecal. Universidad Nacional Autónoma de México 2007; 18-19.
12. Cravioto A, Reyes RE, Ortega R. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Rev Epidemiol* 1998; 101:123.
13. Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De La Roca JM, *et al.* Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J Epidemiol* 1990; 131:886-904.
14. Mancera MA, Vázquez NJ, Ontiveros CML, Durán VS, López HB, Tenorio GV. Identificación de *Salmonella enteritidis* en huevo para consumo en la ciudad de México. *Téc Pec México* 2005; 43(2): 229-237.
15. SARH. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. NOM-005-ZOO-1993. Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. Diario Oficial, Méx Sep 1994.
16. Biswas PK, Uddin GMN, Barua H, Roy K, Biswas D, Ahad A, *et al.* Survivability and causes of loss of broody-hen chicks on smallholder households in Bangladesh. *Preven Med Vet* 2008; (83): 260-271.
17. Clarke RC, Gyles CL. *Salmonella*. In Gyles C.L. and C.O. Thoen editors. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2nd ed Iowa State University Press 1993; 133-153.
18. Bolaños SA. *Salmonella enteritidis* en Huevo. Los avicultores y su entorno 2009; 12 (69): 86-88.
19. Gutiérrez-Cogco L, Montiel VE, Aguilera PP, González AM. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México* 2000; 42:490-495.
20. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, México DF SSA 1998; 172, 266, 454.
21. Vázquez NJ, Córdova BC, López VY, Mancera MA. Identificación del gene de la integrasa tipo 1 y perfil de resistencia antimicrobiana en *Salmonella enteritidis*. *VET-UY* 2004. Disponible en: http://www.vet-uy.com/articulos/artic_micro/001/micro001.htm.

22. Drasar BS, Hill MJ. Human intestinal flora. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom 1974; 36–43.
23. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11:142-201.
24. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Jansen WH, García V, Vázquez ML, *et al.* Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). Vet Microb 1998; 61: 229-235.
25. Krause G, Zimmermann S, Beutin L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. Vet Microb 2005; 106: 87-95.
26. Rosario CC, López CC, Téllez IG, Navarro OA, Anderson RC, Eslava CC. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead-in-shell embryos, and chickens with yolk sac infection. Avian Dis 2004; 48:791-802.
27. Long KZ, Wood JWE, Vasquez GE, Weiss KM, Mathewson JJ, De La Cabada FJ, *et al.* Proportional hazards analysis of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and breast feeding in a cohort of urban Mexican children. Am J Epidemiol 1994; 139:193–205.
28. Wood LV, Ferguson LE, Hogan P, Thurman D, Morgan D, Dupont HD, *et al.* Incidence of bacterial enteropathogens in foods from Mexico. Appl Environ Microbiol 1983; 46:328–332.
29. La Ragione RM, Best A, Sprigings K, Liebana E, Woodward GR, Sayers AR, *et al.* Variable and strain dependent colonisation of chickens by *Escherichia coli* O157. Vet Microb 2005; 107: 103-113.
30. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, *et al.* Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organization 77 1999; 651–666.
31. Lanyi B, Szita J, Ringelhann A, Kovach K. A waterborne outbreak of enteritis associated with *Escherichia coli* serotype 124:72:32. Acta Microbiol Hung 1959; 6:77–78.
32. Harris JR, Mariano J, Wells JG, Payne BS, Donnel HD, Cohen ML. Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. Am J Epidemiol 1985; 122: 245–252.
33. Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F, Eslava C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet 1991; 337:262–264.
34. Morales DA. Influencia del medio ambiente en la contaminación de las aves domésticas en traspatios de zonas marginadas de tres comunidades de la colonia Manuel González municipio de Zentla, Ver. (Tesis de licenciatura). Veracruz, Ver. Universidad Veracruzana, 2007.
35. Guzmán GP, Avelino FF, Rivera TJA, Castañeda REI, Chávez BE. Resistencia a antimicrobianos y a metales pesados en cepas de *Escherichia coli* aisladas del río Alse seca. Cartel. III Congreso Regional de Ciencias Ambientales 2008.
36. Barnes JH, Vaillancourt J, Gross WB. Colibacillosis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly, McDougald AM, L.R. (Eds.), Diseases of Poultry. 11th ed. Iowa State, University Press, Ames IA 2003; 631–652.
37. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. J Anim Sci 2008; 86: 149-162.
38. Kariuki S, Gilks C, Kimari J, Muyodi J, Getty B, Hart CA. Carriage of potentially pathogenic *Escherichia coli* in chickens. Avian Dis 2002; 46:721-724.

39. Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Annals of Clin Microb* 2007; 6:17.
40. Trabulsi RL, Keller R, Tardelli GAT. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002; 5 (8): 508-513.
41. Doane CA, Pangloli P, Richards HA, Mount JR, Golden DA, Draughon FA. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse farm environments 2007; 70 (1):6-10.
42. Navarro OA, Eslava CCA, León L, Velásquez V, Gutiérrez A, Trejo A, Cravioto A. Respuesta Inmune Heteróloga en Bovinos: Modelo de Estudio Para el Desarrollo de una Vacuna Contra la Colonización por *E. coli* O157 un Patógeno Emergente. *MEMORIA* 2005 10(10):15-16.
43. Escarpulli GC, Aguilera MGA, Cerezo SG, Rodríguez CHH, Chacón MR, Falgás LS, *et al.* El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México?. *Enf Infec y Micro* 2002; 22(4): 206-216.
44. Mancera MA. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México. *Téc Pecu Méx* 2004; 42(2): 287-294.
45. Mcpeake SJW, Smyth JA, Ball HJ. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet Micro* 2005; 110: 245-253.
46. Saucedo CL. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2003; 9 127-131.
47. SESVER-SSA, Boletín epidemiológico 2001; sem 37.
48. SESVER-SSA, Boletín epidemiológico 2002; sem 29.
49. Valdespino GJ, Garcia GM, Del Río ZA. Epidemiology and etiology of infectious diarrreas. The case of Mexico. *Rev. Latinoam. Microbiol* 1994; 36 (4) 307-24.
50. Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. In: *Methods of microbiology*, vol. 14. T. Bergan, ed. Academic Press, London 1984; 43-112.
51. Jean GP. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microb* 2001; 3(7): 421-430.
52. Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for Screening of Enteraggregative *Escherichia coli*. *J of Clin Microb* 2004; 33(3): 701-705.
53. Ruiz FG, Constantino CF, Quintana LJA, Cedillo PC, Urquiza BO. Pathogenesis of *Salmonella Enteritidis* PT 13^a and *Salmonella Enteritidis* biovar Issatschenko in broiler chickens. *Vet Méx* 2008; 39 (2).

Cuadros y figuras

Cepa	Gen	Número bases	Amplicón (pb)	Secuencia	Ref.
ETEC	<i>ht</i>	20	450	F:5' ggc gac aaa tta tac cgt gc 3'	López-Saucedo (2003)
		20		R:5' cgg tct cta tat tcc ctg tt 3'	
EPEC	<i>st</i>	21	190	F:5' att ttt ctt tct gta tgg tct t 3'	López-Saucedo (2003)
		20		R:5' cac ccg gta caa gca gga tt 3'	
EPEC	<i>bfpA</i>	21	324	F:5' aat ggt gct tgc gct tgc tgc 3'	López-Saucedo (2003)
		21		R:5' gcc gct tta tcc aac ctg gta 3'	
EHEC	<i>eae A</i>	20	384	F:5' gac ccg gca caa gca taa gc 3'	López-Saucedo (2003)
		20		R:5' cca cct gca gca aca aga gg 3'	
EHEC	<i>stx1^a</i>	22	150	F:5' ctg gat tta atg tgg cat agt g 3'	López-Saucedo (2003)
		21		R:5' aga acg ccc act gag atc atc 3'	
EIEC	<i>stx2</i>	21	255	F:5' ggc act gtc tga aac tgc tcc 3'	López-Saucedo (2003)
		21		R:5' teg cca gtt atc tga cat tct 3'	
EIEC	<i>Iai^b</i>	21	650	F:5' ggt atg atg atg atg atg cca 3'	López-Saucedo (2003)
		20		R:5' gga ggc caa caa tta ttt cc 3'	
EAEC	pCVD432	20	630	F:5' ctg gcg aaa gac tgr atc at 3'	Schmidt H. (2004)
		22		R:5' caa tgr ata gaa atc cgc tgt t 3'	

^a GenBank accession no. M17358

^b GenBank accession no. D13663

Cuadro 1. Iniciadores utilizados en la prueba de PCR para la identificación de *E. coli* diarreogénica.

Cuadro 2. Cepas utilizadas como controles en la prueba de PCR.

Genes	Controles
<i>lt</i>	449c2
<i>st</i>	H10407
<i>bfpA, eaeA</i>	IB00410
<i>stx1, stx2</i>	IB00446
<i>ial</i>	EIEC L-
pCVD432	EAEC O42

Cuadro 3. Total de microorganismos identificados de las 290 colonias.

Microorganismo	No. de cepas (%)			Total
	Casa 1	Casa2	Casa3	
<i>E.coli</i>	79 (87.7%)	99 (99%)	89 (89%)	267
<i>Aeromonas</i> sp	11 (12.2 %)	1 (1%)	4 (4%)	16
<i>Klebsiella</i> sp			4 (4%)	4
<i>Enterobacter</i> sp			3 (3%)	3
Total	90	100	100	290

Cuadro 4. Serogrupos más frecuentes de los 145 aislados por casa.

Serogrupo	Casa 1	Casa 2	Casa 3	TOTAL
OND	7	4	16	27
O8	3	10	5	18
O178	-	3	8	11
O7	4	2	4	10
O44	5	-	1	6
O162	-	6	-	6
O181	6	-	-	6
O15,O51,O117	-	5*	-	15
O153	2	3	-	5
O4	-	-	4	4
O138	-	4	-	4
O100,O174	3*	-	-	6
O141	1	1	1	3
O2,O142,O154	-	-	2*	6
O25,O113,O159	2*	-	-	6
O20	1	-	1	2
O39	-	2	-	2
O10,O112ac,O158,O166	1*	-	-	4
O6,O9,O112ab,O168	-	-	1*	4
TOTAL				145

*Se refiere al número de aislamiento para cada serogrupo indicado

Cuadro 5. Total de serotipos encontrados en todas las cepas y su ocurrencia en las aves.

Serotipo	Total(%)	No. De aves*	Presencia en casas**
O8:H11	7(9.4%)	5	3
O4:H16	4(5.4%)	3	1
OND:H11	4(5.4%)	3	2
O7:H15	4(5.4%)	2	2

*Número de aves donde se identificó el serotipo

**Número de casas en el que se detectó el serotipo

Cuadro 6. Serogrupos encontrados por casa asociados a patotipos diarreogénicos de *E. coli*.

No.de casa	Grupos diarreogénicos				
	EPEC	ETEC	EHEC	EAEC	EIEC
1	O20,O44,O158, O159	O8,O20,O25,O153, O159,O166	O113	O7,O44,O76	O112ac, O159
2		O8,O153	O117	O7	
3	O20,O44,O142	O6,O8,O20	O4	O7,O44	

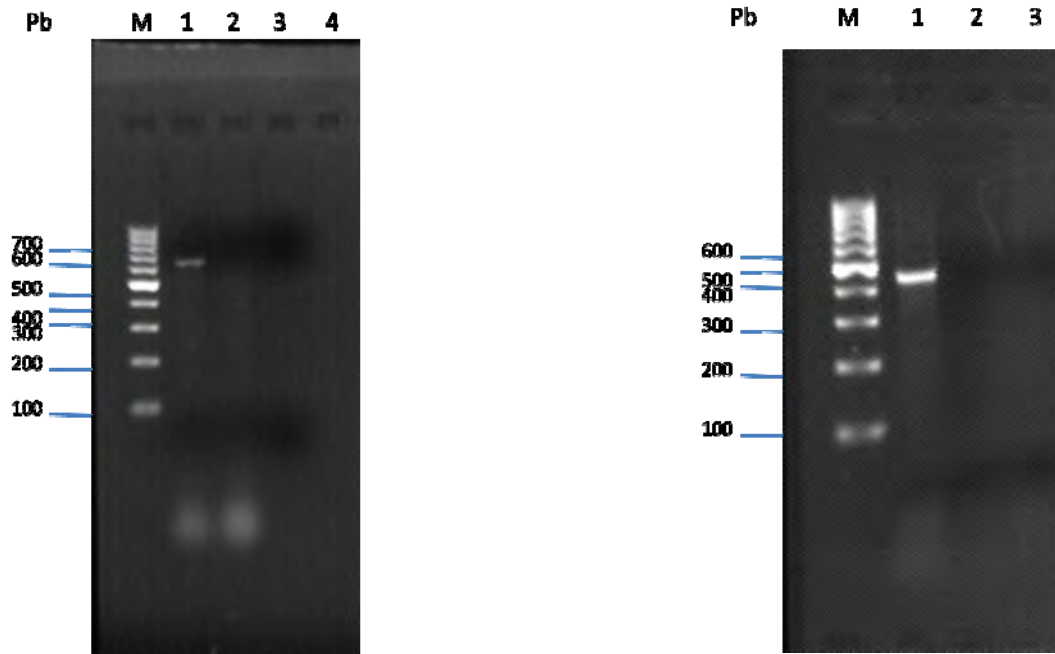


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa. Izquierda, línea 1, cepa control EAEC O42 pCVD432 +; línea 2, control negativo (*E. coli* K12), línea 3, mezcla de reacción. Derecha, línea 1, control positivo para el gen *lt* cepa 449c2, línea 2, control negativo (K12), línea 3, mezcla de reacción.