



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

**ASOCIACIÓN ENTRE LETALIDAD Y PRESENCIA DE GENES DE
VIRULENCIA EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE AVES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

GUSTAVO AARÓN RAMÍREZ BARRERA

TUTOR: CECILIA ROSARIO CORTÉS

COMITÉ TUTORAL: CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS
NESTOR LEDESMA MARTÍNEZ



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 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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ. En especial al Dr. Nestor Ledesma Martínez.

Al Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM. En especial al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos.

A mi tutora: Dra. Cecilia Rosario Cortés que me brindo la oportunidad de trabajar a su lado.

	pág.
	CONTENIDO
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
A) <i>Escherichia coli</i>	1
B) <i>Escherichia coli</i> en aves	1
C) Factores de virulencia	2
a. Supervivencia aumentada en suero (Iss)	3
b. Hemaglutinina termosensible (Tsh)	3
c. Sideróforos	3
d. Toxina de distensión citoletal (Cdt)	4
e. Gen de invasividad <i>ipaH</i>	4
D) Determinación de virulencia en cepas de <i>Escherichia coli</i>	5
E) Antecedentes y justificación	6
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
HIPÓTESIS	7
2. MATERIAL Y MÉTODOS	8
A) Cepas bacterianas	8
B) Identificación serológica	8
C) Prueba de letalidad embrionaria	10
D) Determinación de la presencia de genes de virulencia	11
3. RESULTADOS	13
A) Identificación serológica	13
B) Prueba de letalidad embrionaria	13
C) Determinación de la presencia de genes de virulencia	14
4. DISCUSIÓN	16
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	20
6. BIBLIOGRAFÍA	21

RESUMEN

RAMÍREZ BARRERA GUSTAVO AARÓN. Asociación entre letalidad y presencia de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aves. Tutor: Cecilia Rosario Cortés. Comité Tutorial: Carlos Alberto Eslava Campos y Nestor Ledesma Martínez

En las aves, *Escherichia coli* tiene gran importancia ya que es uno de los patógenos bacterianos que se aísla con mayor frecuencia. A pesar de la importancia de la enfermedad, se desconocen muchos de los mecanismos de virulencia de las cepas aviares de *E. coli*. En este trabajo se identificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia de genes de virulencia descritos para el grupo APEC en 173 cepas de *E. coli* aisladas en México a partir de muestras obtenidas en granjas de reproductoras, incubadora y pollo de engorda y se relacionaron con la virulencia observada en la prueba de letalidad en embriones de pollo. La prueba de letalidad mostró que 84 cepas fueron virulentas, 40 moderadamente virulentas y 49 no virulentas. La PCR fue diseñada con base en las secuencias de los genes de aerobactina (*iucD*), proteína de captura de hierro (*irp2*), hemaglutinina sensible a la temperatura (*tsh*), proteína del aumento de la supervivencia en el suero (*iss*), mecanismo enteroinvasivo (*ipaH*) y la toxina de distensión citoletal (*cdtB*). El 82.66% de las cepas presentaron al menos uno de los seis genes, y solamente el 17.34% de las cepas fueron negativas a todos; los de mayor prevalencia fueron *tsh* (62.43%) e *iss* (54.91%); y su combinación la de mayor frecuencia (17.34%). La relación de los resultados de letalidad embrionaria y de PCR mostró que el porcentaje de cepas negativas a todos los genes es de 44.90% para cepas no virulentas y de 20% para cepas moderadamente virulentas, mientras que todas las cepas virulentas poseían al menos uno de los genes. En el presente estudio se corroboró que la prueba de letalidad en embriones de pollo permite distinguir los aislamientos virulentos y no virulentos de *E. coli* en aves. Así mismo, se encontró una relación entre la virulencia y la presencia de los genes *iss* y *tsh*, lo que sugiere que estos genes pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de la infección de aves jóvenes, por lo que podrían ser utilizados como marcadores en el diagnóstico y la detección de cepas patógenas aviares de *E. coli* en México asociadas a la mortalidad temprana en pollito.

Palabras Clave: *Escherichia coli*, aves, letalidad en embrión de pollo, genes de virulencia.

ABSTRACT

RAMÍREZ BARRERA GUSTAVO AARÓN. Association between lethality and virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from poultry. Tutor: Cecilia Rosario Cortés. Comité Tutorial: Carlos Alberto Eslava Campos y Nestor Ledesma Martínez

Escherichia coli is an important pathogen in poultry since it is one of the most frequently isolated from infection in broilers and laying hens. Despite the importance of colibacillosis, the virulence mechanisms employed by avian *E. coli* remains unknown. The aim of the present work was to identify the relationship between embryonic chicken lethality and virulence genes described for the APEC in *E. coli* strains isolated from México. Multiplex PCR protocol targeting genes for aerobactin (*iucD*), iron-repressible protein (*irp2*), temperature-sensitive hemagglutinin (*tsh*), increased serum survival protein (*iss*), enteroinvasive mechanism (*ipaH*) and cytolethal distending toxin (*cdtB*) were performed. Lethality test showed that 84 out of 173 strains were virulent, 40 moderately virulent and 49 avirulent. The eighty two percent of the strains showed at least one of the six genes, and only 17.34% of the strains were negative to all of them. The most prevalent genes were *tsh* (62.43%) and *iss*(54.91%) as well as their combination (17.34%). The relationship of embryonic lethality and gene detection showed that the percentage of negative strains was 44.90% for avirulent strains and 20% for moderately virulent strains, whereas all virulent strains possessed at least one gene. The present study confirmed that lethality test in chicken embryos was able to distinguish between virulent and avirulent isolates of *E. coli* in poultry. Likewise, there was a relationship between virulence and the presence of *iss*, and *tsh* genes, suggesting that these genes may play an important role in the pathogenesis of colibacillosis in young chickens, and could be used as markers in diagnosis and detection of pathogenic avian *E. coli* in Mexico.

Keywords: *Escherichia coli*, avian, embryonic lethality test, virulence genes.

INTRODUCCIÓN

A) *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo Gram negativo, móvil o inmóvil, de 2 a 3 micras de longitud por 0.6 micras de ancho, aerobio o anaerobio facultativo, no esporulado que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Forma ácido y gas a partir de lactosa, es indol positivo, fermenta glucosa, manitol y lactosa. Crece a temperaturas entre 15 y 45 °C, con un pH óptimo de 7.0 y en agar McConckey (McC) produce colonias brillantes, circulares y rosadas¹⁻³. Su clasificación serológica es muy similar al esquema de Kauffman-White para *Salmonella* sp. La nomenclatura utilizada para la identificación serológica de *E. coli* es la siguiente:

El antígeno somático (O) está formado por la porción polisacárida de la molécula del lipopolisacárido, presente en la membrana externa de la bacteria, de éstos se reconocen al menos 183 grupos.

El antígeno capsular (K) se encuentra como envoltura de los antígenos somáticos y pueden enmascarar la aglutinación de ellos; se reconocen al menos 70 antígenos.

Antígeno Flagelar (H), se encuentran formados por flagelina, constituye el órgano de locomoción de la bacteria, y se han identificado 56 grupos⁴⁻⁸.

La designación serotipo se utiliza para la expresión de los tres grupos de antígenos presentes en una cepa; cuando sólo se hace referencia al antígeno O se usa el término serogrupo⁵.

B) *Escherichia coli* en aves

En las aves, las cepas de *E. coli* son habitantes normales del intestino donde sintetizan algunas vitaminas del complejo B, además, contribuyen a eliminar ciertos microorganismos proteolíticos presentes en el intestino. Sin embargo, existen serotipos como O1, O2, y O78 que se han aislado con mayor frecuencia a partir de aves enfermas, estas cepas de *E. coli* tienen gran importancia ya que se encuentran entre los patógenos bacterianos que se

aíslan con mayor frecuencia⁹; y se ha relacionado con aerosaculitis, dermatitis, peritonitis, enteritis, enfermedad de sacos aéreos, pericarditis, perihepatitis, salpingitis, sinovitis, osteomielitis, celulitis e infección del saco vitelino. Por otro lado, es considerado como responsable de al menos 5% de mortalidad en parvadas comerciales, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria avícola⁹⁻¹². Se estima que en los Estados Unidos de América las pérdidas ocasionadas por *E. coli* superan los cien millones de dólares anuales¹⁰; aunque en México no se tiene calculado el impacto económico de las infecciones ocasionadas por la colibacilosis, se estima que son cuantiosas y que repercuten tanto en los costos, como en la calidad de la carne de pollo para consumo humano.

C) Factores de virulencia

Las cepas patógenas de *E. coli* de origen aviar se reúnen dentro del grupo denominado APEC (por las siglas en inglés de Avian Pathogenic *Escherichia coli*)^{9,11-16}. Estas cepas poseen factores de virulencia entre los que se encuentran la producción de colicina V (Col V), expresión de la fimbria tipo F1, letalidad embrionaria, presencia de la proteína Iss (supervivencia aumentada en suero), hemaglutinina termosensible (Tsh), resistencia al complemento, presencia de cápsula, sistema quelante de hierro aerobactina, producción de toxinas y citotoxinas^{11-14,16-21}. Por otra parte, se ha reportado que el grupo APEC se encuentra básicamente compuesto por serotipos clásicos de los grupos enteropatógeno (EPEC) y enterotoxigénico (ETEC)²². Aunque la producción de colicinas, particularmente Col V, ha sido reportada como factor de virulencia en las cepas APEC, Quackenbush and Falkow²³ mostraron que los genes que codifican para la producción de colicinas no son necesarios para la patogénesis de *E. coli*. La importancia de Col V radica en que está codificada en un plásmido que generalmente contienen otros factores de virulencia como sideróforos, proteína Iss, y Tsh, así como para la resistencia a diferentes antibióticos²⁴⁻²⁶.

a) Proteína Iss

La secuencia del gen *iss* fue identificada por primera vez por Chuba *et al.* ²⁷, en cepas de *E. coli* que poseían un plásmido. Este gen codifica para una lipoproteína de membrana externa involucrada en la resistencia al suero sanguíneo llamada Iss. Trabajos previos ²⁸⁻³⁰ muestran que la resistencia al complemento juega un papel importante en la virulencia de las cepas APEC y el gen *iss* ha sido asociado a ella. Pfaff-McDonough *et al.* ²⁹ encontraron que la presencia del gen *iss* es mayor en aislamientos a partir de aves enfermas que de aves sanas. En su estudio, Johnson *et al.* ³⁰ sugieren que las cepas de *E. coli* que poseen resistencia al complemento y el gen *iss* pueden indicar su capacidad para producir enfermedad.

b) Hemaglutinina termosensible

Tsh es una proteína autotransportada secretada por cepas de *E. coli* que colonizan las vías respiratorias y causan enfermedad de sacos aéreos y pericarditis. Provence and Curtiss ³¹ reportan que Tsh es homologa de la serinproteasa inmunoglobulina A1, y que actúa como una hemaglutinina y una proteasa por igual. Por otra parte, el gen que codifica para Tsh se ha encontrado en *E. coli* patógenas aisladas de aves pero no en comensales; ¹⁹ de igual manera, Maurer *et al.* ³² describen que el 46% de los aislamientos patógenos que analizaron fueron positivos al gen *ths*. Dozois *et al.* ³³ determinaron que *tsh* frecuentemente se localiza en el plásmido Col V en cepas patógenas de *E. coli*.

c) Sideróforos

Los sideróforos son compuestos orgánicos quelantes de hierro (Fe) producidos y secretados por bacterias. *E. coli* produce dos tipos: enterobactina y aerobactina. Ésta última puede ser más efectiva que la enterobactina en la competencia por el hierro, ya que esta última es inactivada por la albúmina, en cambio la aerobactina no se une a la albúmina y le permite a la bacteria obtener el hierro necesario ³⁴. Trabajos previos ³⁵⁻³⁷ reportan que la producción de aerobactina se ha encontrado en mayor proporción en cepas patógenas de

E. coli. Neilands *et al.* ³⁸ determinaron que las cepas productoras de aerobactina poseían el plásmido pColV-K30, el cual contiene un operón para la síntesis de este sideróforo, y otros factores de virulencia, como la producción de Col V, hemoglobina, proteasa, así como la resistencia a diferentes antimicrobianos. Los sistemas quelantes de hierro han sido reconocidos como un factor importante de la virulencia en *E. coli*, aunque, por sí mismos, no se han visto implicados directamente en ella ³⁹.

d) Toxina de distensión citoletal (Cdt)

Los primeros en describir Cdt en cepas de *E. coli* fueron Johnson and Lior ⁴⁰. Ésta induce elongación, distensión y muerte de las células en 3 ó 4 días, debido a un bloqueo del ciclo celular en la fase G2 de la mitosis, lo que permite la síntesis de ARN y proteínas, pero inactiva la división celular ^{41,42}. Los genes que codifican para Cdt se encuentran principalmente en el cromosoma de cepas enteropatógenas de *E. coli* ^{43,44}; sin embargo, se pueden encontrar localizados en el plásmido pVir que codifica para la fimbria F17 y el factor necrosante citotóxico tipo 2 ⁴².

e) Gen de invasividad (*ipaH*)

El gen *ipaH* es característico de las cepas enteroinvasivas de *E. coli* (EIEC) y *Shigella* sp., las cuales están relacionadas genética y bioquímicamente ⁴⁵. Rosario *et al.* ⁴⁶ determinaron la presencia de genes de virulencia de cepas diarreogénicas, entre ellos, el gen de invasividad *ipaH*; lo que sugiere la existencia de clonas específicas de *E. coli* invasivas adaptadas al hospedero aviar en México, este fue el primer reporte que demuestra la presencia en aves de cepas de *E. coli* invasivas extraintestinales (ExIEC).

D) Determinación de virulencia en cepas de *Escherichia coli*

En la actualidad, para la detección de cepas de *E. coli* patógenas en las aves se utilizan diversas metodologías. Las primeras pruebas presuntivas son las bioquímicas y la serología, pero ninguna de ellas indica si la bacteria es virulenta o no. Recientemente, para determinar si una cepa se puede considerar virulenta se han identificado ciertos factores por medio de la detección de los genes que codifican para ellos. El control de colibacilosis se ha dificultado ya que no se cuenta con una prueba de diagnóstico confiable que determine si los aislados, independientes de su serotipo o sus factores de virulencia, se pueden considerar patógenos primarios (cepas virulentas), patógenos secundarios (cepas moderadamente virulentas), o bien, apatógenos (cepas no virulentas). Con este fin, se han descrito varios métodos, como la inoculación de aves de diferentes edades por vía subcutánea, intravenosa o intratraqueal, así como la utilización de embriones de pollo. Este último método tiene las ventajas de utilizar poco espacio, bajo costo y fácil manejo ^{14,16,19,47-51}, por lo cual, la prueba de letalidad embrionaria puede considerarse idónea para medir la virulencia de aislados de *E. coli* aviar. Wooley *et al.* ⁵² demostraron que se puede probar la virulencia y detectar diferencias entre cepas virulentas, moderadamente virulenta, y a virulentas con sólo 11 embriones por cada cepa.

E) Antecedentes y justificación

A pesar de la gran cantidad de información que se ha generado respecto a las cepas APEC en otros países, la incidencia de serotipos y genes de virulencia en México se ha comenzado a investigar recientemente. Debido a la importancia de la colibacilosis en México ^{53,54}, se han realizado dos trabajos en los que se identificaron cepas de *E. coli*, a partir de muestras obtenidas en granjas de reproductoras, incubadora y pollo de engorda. El primer estudio se llevó a cabo para establecer el papel de *E. coli* en la infección del saco vitelino (ISV). En este estudio, se mostró que *E. coli* fue la bacteria que se aisló con mayor frecuencia ⁵³, y los serogrupos predominantes fueron O19, O84 y O8, los cuales no habían sido reportados como patógenos para las aves ⁴⁶. Adicionalmente, se encontraron genes de virulencia reportados en cepas diarreogénicas de humanos, entre ellos, el gen de invasividad *ipaH*, el gen *eae*, y el gen *cdt*. Otra característica de estas cepas fue la resistencia antimicrobiana a dos o más antibióticos. Debido al hallazgo de estas cepas con características diferentes a las reportadas en otros países, fue necesario profundizar en el estudio de los factores de virulencia de las cepas aviarias mexicanas de *E. coli*. Para ello, se realizó el segundo trabajo ⁵⁴ en el que se observó que las cepas no poseían los genes de virulencia detectados en el primer estudio, además los serogrupos con mayor prevalencia fueron diferentes (O20, O8 y O131). Sin embargo, la resistencia de las cepas a dos o más antimicrobianos fue similar. Debido a que estas cepas son capaces de producir enfermedad, es posible que sean portadoras de otros genes de virulencia, como los descritos para el grupo APEC; por lo cual, es necesario realizar un estudio para determinar los factores de virulencia descritos para el grupo APEC que poseen estos dos grupos de cepas. Con esta información se contribuirá al mejor entendimiento de la patogénesis de la colibacilosis, para un mejor control y prevención de esta enfermedad con el fin de disminuir los costos ocasionados por ella en la avicultura.

OBJETIVO GENERAL

Identificar mediante la técnica de PCR múltiple la presencia de genes de virulencia descritos para el grupo APEC en las cepas de *Escherichia coli* aisladas en México que explique la virulencia observada en la prueba de letalidad en embriones de pollo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar la presencia de los genes de virulencia (*tsh*, *iss*, *irp2*, *iucD*, *cdtB*, *ipaH*) mediante la técnica de PCR múltiple.

Cuantificar el grado de virulencia de las cepas mediante un modelo de letalidad embrionaria.

Establecer si existe una correlación entre la presencia de genes de virulencia y el grado de letalidad en los embriones inoculados.

HIPÓTESIS

Las cepas que muestren ser virulentas mediante la prueba de letalidad en embriones de pollo, estarán relacionadas con al menos uno de los genes de virulencia descritos para el grupo APEC (*tsh*, *iss*, *irp2*, *iucD*, *cdtB*, *ipaH*).

MATERIAL Y MÉTODOS

A) Cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* analizadas en el presente estudio fueron previamente aisladas en empresas integradas de pollo a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda; consta de 76 y 97 cepas. En estudios previos Rosario *et al.*⁴⁶ y Ramírez *et al.*⁵⁴ caracterizaron las cepas descritas (serotipificación, producción de colicinas, y resistencia antimicrobianos). Para su recuperación las cepas fueron sembradas partir del medio de conservación (Dorset) en agar MacConkey (McC)^a y agar de soya tripticaseína (TSA)^b e incubadas a 37°C durante 18 horas. Se llevó a cabo la detección de colonias lactosa positiva en las placas de McC y a partir de ellas se realizó el aislamiento en cultivo puro. Posteriormente, se sembraron en gelosa especial como copias de trabajo y fueron incubadas a 37°C durante 18 horas.

B) Identificación serológica

La serotipificación de las cepas de *E. coli* se realizó de acuerdo al procedimiento empleado en el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la UNAM y a lo referido por Orskov y Orskov⁸, con la utilización de sueros monovalentes específicos (SERUNAM), obtenidos de conejo Nueva Zelanda blanco.

Las reacciones de aglutinación se efectuaron en microplacas de 96 pozos de fondo redondo^c. Se analizó el antígeno somático de cada cepa, con el empleo de una batería con 181 sueros monovalentes obtenidos de los antígenos somáticos conocidos, 47 para diferentes especies de *Shigella*.

a. Agar MacConkey. Bioxon. Lot. 8210209

b. Agar de Soya Tripticaseína. Bioxon. Lot. 7115904

c. Microplaca 96 pozos fondo redondo. Greiner bio-one. Lot. 5665692

En el caso de los antígenos flagelares se utilizaron 56 sueros específicos correspondientes a los antígenos conocidos; en este caso, los sueros se encontraban diluidos 1:100.

Para la obtención del antígeno somático (O) las cepas fueron sembradas individualmente en tubos con 10 mL de TSA inclinado con un pH de 7.2. Éstos fueron incubados durante 24 horas a 37°C, después de las cuales, el crecimiento obtenido fue cosechado en 10 mL de solución salina 0.15M. La suspensión obtenida fue transferida a otro tubo, e inactivada por esterilización a vapor fluente a 100°C con 3 a 5 libras de presión durante una hora. Una vez enfriado el antígeno se adicionó solución salina fisiológica (SSF) con formaldehído al 0.6 % (v/v) ^d. Finalmente, esta suspensión bacteriana fue empleada como antígeno somático para la identificación del grupo O.

Por otro lado, se prepararon las microplacas colocando en cada pozo 50 µl del suero monovalente con un dispensador ^e. Una vez llenas las microplacas, se procedió a colocar 50 µl del antígeno somático preparado con antelación. Las placas fueron envueltas con un papel adherente para evitar la evaporación durante la incubación que se realizó a 50°C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a realizar la interpretación de los resultados con la ayuda de un aglutinoscopio. Se consideró como positivo la presencia de aglutinación en el fondo de los pozos. De igual forma se identificaron los sueros que reconocían el antígeno bacteriano y se hicieron diluciones de estos desde 1:100 hasta 1:12800. Cuando se presentaban reacciones cruzadas, el antígeno se enfrentó con sueros absorbidos y diluidos 1:50. El serogrupo se definió al determinar el mayor grado de aglutinación en la dilución más alta del suero en comparación con la que se presenta con el antígeno homólogo. Se consideró como reacción negativa la que presentó un botón de antígeno en el fondo del pozo.

d. Formaldehído. Sigma Lot.78H3573

e. Dispensador. Quick Spense Controller Mod. QSIIe y reservoir Model 96-200 DYNATECH LABORATORIES

C) Prueba de letalidad embrionaria

La virulencia de las 173 cepas de *E. coli* fue probada mediante un modelo de letalidad en embrión de pollo según lo descrito por Wooley *et al.*⁵² Brevemente, las cepas de estudio, así como los testigos positivo y negativo fueron sembrados en 12 mL de caldo infusión cerebro corazón (CICC)^f e incubadas a 37°C durante 18 horas en una incubadora con agitación a 200 rpm^g, posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante; la pastilla obtenida fue resuspendida en 12 mL de PBS estéril con un pH de 7.2; este procedimiento de lavado se ejecutó tres veces bajo las mismas condiciones y la pastilla final obtenida fue resuspendida en 10 mL de PBS estéril (pH 7.2). La concentración de bacterias fue ajustada con un espectrofotómetro^h a una concentración de 1×10^9 unidades formadoras de colonias por mL (UFC/ mL); a partir de este inóculo se hicieron diluciones décuples seriadas y fueron sembrados 100 μ L de las diluciones 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} en placas de agar de soya tripticaseína (TSA) e incubadas durante 24 horas a 37°C, después de este tiempo se realizó el conteo de colonias de cada dilución para determinar la concentración bacteriana. De la dilución 10^{-3} se tomaron 0.1 mL (100 bacterias aproximadamente) para su inoculación en cavidad alantoidea en 11 embriones libres de patógenos específicosⁱ de 12 días de edad para cada cepa probada. Los huevos embrionados fueron visualizados mediante un ovoscopio para determinar la viabilidad, situar la cámara de aire y determinar el sitio de inoculación; para posteriormente inocular vía cavidad alantoidea. Para este ensayo se utilizó como testigo positivo una cepa virulenta del serotipo O1; como testigo negativo, una cepa K-12, y como testigo de esterilidad se inoculó un grupo de 5 embriones con 100 μ L de PBS estéril. Todos los grupos se incubaron bajo condiciones comerciales (37.7 °C y 60 % de humedad).

f. Caldo infusión cerebro corazón. Bioxon. Lot. 3421269

g. Incubadora con agitación. Shaker modelo G-24 New Brunswick Scientific Edison NJ, USA

h. Espectrofotómetro. Beckman Du. 640B

i. Embriones libres de patógenos específicos. ALPES 1 S.A. de C. V.

Diariamente, mediante el uso de un ovoscopio, fue determinada la mortalidad embrionaria durante 4 días y se registró para su análisis posterior.

D) Determinación de la presencia de genes de virulencia

Se realizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la utilización de los iniciadores y mediante la modificación de las técnicas descritas en el cuadro 1. Para poder realizar la identificación de los genes descritos, se estandarizaron tres distintas PCR's; dos de amplificación múltiple para los genes (*iucD*, *cdtB* e *irp2*) y (*tsh* e *ipaH*), y una simple para el gen (*iss*). La mezcla de PCR múltiple (*iucD*, *cdtB* e *irp2*) consistió de 20 µL totales, 2 µL Tris-HCl-KCl, 0.8 µL MgCl₂, 2 µL dNTP's, 0.2 µL Taq polimerasa ^j, 3 µL de pares de iniciadores (1µL por par de iniciador), 9 µL de agua, y 3 µL de ADN (una colonia bacteriana hervida en 2 mL de agua estéril). Se utilizó un termociclador^k con las siguientes condiciones de amplificación: 95°C (5 min, 1 ciclo); 95°C, 50°C, y 72°C (30 segundos, 30 ciclos); y una extensión final (10 min, 72°C). Para los genes *tsh* e *ipaH* la mezcla consistió de 20 µL totales, 2 µL Tris-HCl-KCl, 1.2 µL MgCl₂, 2 µL dNTP's, 0.2 µL Taq polimerasa ^j, 2 µL de pares de iniciadores (1µL por par de iniciador), 9.6 µL de agua, y 3 µL de ADN, y las condiciones de amplificación: 95°C (5 min, 1 ciclo); 95°C, 56°C, y 72°C (30 segundos, 30 ciclos); y una extensión final (10 min, 72°C). La mezcla de PCR para el gen *iss* consistió de 20 µL totales, 2 µL Tris-HCl-KCl, 1.6 µL MgCl₂, 2 µL dNTP's, 0.2 µL Taq polimerasa ^j, 1 µL de par de iniciadores, 10.2 µL de agua, y 3 µL de ADN, con 95°C (5 min, 1 ciclo); 95°C, 65°C, y 72°C (30 segundos, 30 ciclos); y una extensión final (10 min, 72°C).

j. Taq polimerasa INVITROGEN ©

k. Termociclador. GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems

Los productos obtenidos mediante la prueba de PCR fueron analizados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 3% (*iucD*, *cdtB* e *irp2*) y al 1% (*tsh*, *ipaH* e *iss*) a 96mVolts. Los productos amplificados fueron teñidos con bromuro de etidio y vistos en un transiluminador de luz ultravioleta^L. Se consideró como un resultado positivo la aparición de una banda de un tamaño igual al descrito para cada uno de los iniciadores. Se utilizó como marcador DNA Ladder de 250 pb^m.

Los resultados de la serotipificación, letalidad embrionaria, PCR y producción de colicinas [resultados previamente reportados por Rosario *et al.*⁴⁶], fueron comparados entres sí para establecer alguna relación entre estas características.

L. Transiluminador. Hoefer Mod. UVTM-25.

m. Marcador DNA Ladder de 250 pb (DNA ladder INVITROGEN ®).

RESULTADOS

A) Identificación serológica

Se corroboró la identificación serológica de las 173 cepas^{53,54}. El cuadro 2, muestra el número y porcentaje de serogrupos predominantes; en él, se observa que los más frecuentes fueron los no tipificables O? (15.61%), O2 (12.72%), los de reacción inespecífica OR (8.09%), O20 (6.36%), seguidos por los serogrupos O8 y O100 con un 4.62% mientras que el 4.05% correspondió a cepas del serogrupo O131.

B) Prueba de letalidad embrionaria

La prueba de letalidad en embrión de pollo mostró que de las 173 cepas 84 fueron virulentas, 40 moderadamente virulentas y 49 no virulentas (figura 1). Los resultados de la mortalidad embrionaria por día se muestran en la figura 2. El primer día post-inoculación se observó que la mortalidad fue muy similar para las cepas virulentas (7.51%), el control positivo (6.90%) y las cepas no virulentas (8.67%); sin embargo, los porcentajes de cepas no virulentas disminuyó con el paso de los días y el de las cepas virulentas aumentó. El porcentaje de mayor mortalidad se observó el día dos post-inoculación en las cepas virulentas (28.90%), moderadamente virulentas (12.14%), al igual que en el testigo positivo (27.27%). Mientras que para los embriones inoculados con la cepa K-12 (3.03%) y PBS (3.47%) se observaron el primer día post-inoculación. La mortalidad de las cepas virulentas en el segundo día fue de 28.90% y de 4.62% para las cepas no virulentas, las cuales tuvieron un comportamiento similar a la apreciada en las cepas usadas como testigo positivo (27.27% cepa O1, virulenta) y testigo negativo (1.52% cepa K-12, a virulenta).

Con los resultados de la serotipificación y de la prueba de letalidad embrionaria, se pudo apreciar la relación de los serogrupos de acuerdo a su virulencia, en el cuadro 4 se puede observar que los serogrupos con mayor

porcentaje de cepas virulentas fueron O2 (20.24%), O? (10.71%), O20 (8.33%), O131, O84 y O25 con 5.95% cada uno.

Se logró determinar que los serogrupo O25, O85, O167, O16, O129, O48, O3, O127 y O125 se presentan únicamente en cepas virulentas, mientras que O34, 141, O22, O4, O81; y los serogrupos O112, O118, O146, O155, O165, O166, O79, O9 se presentan solamente en cepas moderadamente virulentas y no virulentas, respectivamente (cuadro 5).

C) Determinación de la presencia de genes de virulencia

La prueba de PCR permitió identificar las cepas portadoras de los genes buscados (*tsh*, *iss*, *irp2*, *iucD*, *cdtB* e *ipaH*) como se puede observar en la figura 3, en la que se muestran las bandas correspondientes a los genes, *iucD* (714 pb), *cdtB* (430 pb) e *irp2* (413 pb); en la figura 4 se aprecian las bandas correspondientes a los genes *tsh* (420 pb) e *ipaH* (600 pb) y en la figura 5 se muestra la banda correspondiente al gen *iss* (760 pb).

Solamente 30 cepas (17.34%) fueron negativas a todos los genes buscados; mientras que los de mayor prevalencia fueron *tsh* (62.43%) e *iss* (54.91%); mientras que el gen *ipaH* se encontró en menor frecuencia (6.36%). La proporción de todos los genes se puede observar en la figura 6.

La presencia de genes, así como sus distintas combinaciones, se observan en el cuadro 3. La combinación *tsh-iss* fue la que se presentó con mayor frecuencia (17.34%), seguida por el *iucD* y *tsh* con 10.40% cada uno, mientras que la combinación de los genes *iucD-cdtB-irp2-tsh-iss* se observó en un 9.83%; cabe mencionar que ninguna de las cepas presentó todos los genes buscados, mientras que el 82.66% de las cepas presentaron al menos uno de los seis (*tsh*, *iss*, *irp2*, *iucD*, *cdtB* e *ipaH*).

La relación de los resultados de letalidad embrionaria y de PCR mostró que el porcentaje de cepas negativas a todos los genes es de 44.90% para cepas no virulentas y 20% para cepas moderadamente virulentas; mientras que todas las cepas virulentas poseían al menos un gen de virulencia (cuadro 6). Asimismo, la proporción de los genes *iucD*, *cdtB*, *irp2*, *tsh* e *iss*, fue mayor en

cepas virulentas; las combinaciones *tsh-iss*; *iucD-cdtB-irp2-tsh-iss*; *iucD-irp2-tsh-iss*; *cdtB-irp2-tsh-iss*; *iucD-irp2-ipaH-tsh-iss* e *iucD-irp2-iss* sólo se presentaron en cepas virulentas (90.48%), a diferencia de las cepas no virulentas donde sólo hubo una combinación de dos genes *ipaH* y *tsh* (cuadro 7). Un hecho sobresaliente fue que el gen *ipaH* fue el único que se presentó con mayor frecuencia en cepas no virulentas (12.24%) que en cepas moderadamente virulentas (5%) o virulentas (3.57%).

Otra característica que se pudo relacionar fue la virulencia y la producción de colicinas [resultados previamente reportados por Rosario *et al.* (46)]. En el cuadro 8 muestra los resultados de cepas virulentas, moderadamente virulentas y no virulentas con el tipo de colicinas producidas. Se observó que el porcentaje de cepas positivas a Col V fue muy similar en cepas virulentas (8.33%) y no virulentas (10.20%). Sin embargo, se determinó que la producción de otro tipo de colicinas diferentes a Col V se presenta con mayor frecuencia en cepas virulentas (33.33%) que en cepas no virulentas (18.37%), a diferencia de lo que ocurre con las cepas que no producen ningún tipo de colicinas, las cuales se presentan con mayor prevalencia entre las cepas no virulentas (44.90%) que en cepas virulentas (17.86%).

DISCUSIÓN

En el presente estudio *tsh* se encontró en un 62.43% de los aislados y el gen *iss* en un 54.91% como los genes con mayor prevalencia. De igual forma, investigaciones anteriores^{11,29,31-33,56,68-72} han encontrado una alta incidencia de ciertos genes de virulencia en los aislados de pollo, lo que sugiere que podrían ser utilizados como marcadores del grupo APEC, y en consecuencia, para el diagnóstico de la colibacilosis aviar. Ewers *et al.*⁵⁶ mencionan que *tsh*, se presenta entre un 46.0% y 85.0% de los aislados patógenos de *E. coli* aviar, los sistemas de adquisición de hierro como *irp2* y *iucD* se encuentran entre 63.0% y 98.0%; mientras que, la proteína de supervivencia aumentada en suero (*Iss*) se presenta entre 38.5% y 82.7%; finalmente, la presencia del plásmido de colicina V (*pCol V*) se observó entre el 35.5% al 62.7% de los aislados patógenos de *E. coli* aviar. De manera similar a los encontrados en el presente estudio excepto por los genes *iucD* y *irp2* que se presentaron en 35.26% y 28.90% de las cepas respectivamente, resultados por debajo de los rangos mencionados. A pesar de que estudios previos llevados a cabo en México, reportan que los genes *ipaH* y *cdtB* están relacionados con las cepas patógenas de *E. coli* aviar⁵³, en el presente estudio se pudo determinar que la presencia del gen *ipaH* fue del 6.36% y más de la mitad de cepas fueron no virulentas, a diferencia del gen *cdtB* que sólo se presentó en cepas virulentas (33.33%).

Por mucho tiempo la diferenciación entre las cepas virulentas y no virulentas de *E. coli* ha sido un problema diagnóstico en la industria avícola; sin embargo, recientemente la utilización de modelos de letalidad embrionaria para distinguir entre patógenos primarios y oportunistas ha proporcionando un panorama más claro^{14,19,49,50,51,67}. Gibbs *et al.*¹⁹, y Montgomery *et al.*⁶⁷ mencionan que se puede distinguir entre cepas virulentas y no virulentas al inocular 11 embriones de pollo de 12 días de edad con 1×10^2 a 1×10^3 UFC en cavidad alantoidea. Cabe mencionar que en el presente estudio, el porcentaje de mayor mortalidad se observó el día dos post-inoculación en las cepas virulentas (28.90%), y en el testigo positivo (27.27%), lo que concuerda con Wooley *et al.*⁵² quienes observaron este mismo comportamiento. Los

porcentajes de mortalidad para los embriones inoculados con la cepa testigo negativo, se observaron el primer día post-inoculación, lo que puede atribuirse a la manipulación del embrión, ya que Montgomery *et al.*⁶⁷ reportaron que las muertes que ocurren dentro de las primeras 24 horas posteriores a la inoculación, se le atribuyen al trauma de la inoculación.

Varios investigadores como Vandekerchove *et al.*⁷³ Dozois *et al.*³³ y Giovanardi *et al.*⁷⁴ concuerdan que la presencia de *tsh* e *iucD*, está asociada con la virulencia de las cepas de *E. coli* y que rara vez se detectan en aislados de aves sanas. En el presente estudio se determinó que la presencia de *tsh* fue de 62.43% de un total de 173 cepas probadas y se encontró en un 94.05% de las cepas virulentas; no obstante, la presencia de *iucD* fue de 35.26%, y se presentó en menos de la mitad de las cepas virulentas. Por otro lado, algunos estudios reportan que la presencia del gen *iss* es un buen indicador de la virulencia de un aislado de *E. coli* aviar^{19,27,28,34,55-57}; sin embargo, trabajos recientes como los de Vandekerchove *et al.*⁷³ y Ewers *et al.*⁷⁵ mencionan que no hay diferencia entre la resistencia al suero entre los aislados de aves con colibacilosis y los aislados de aves sanas. No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la incidencia del gen *iss* mayor en cepas virulentas (96.43%) que en cepas no virulentas (6.12%). Lo cual sugiere que en las cepas mexicanas el gen *iss* está relacionado con la virulencia en cepas de *E. coli* asociadas a mortalidad temprana de pollitos. En estudios previos^{37,55,63,69} se reportó que la combinación de distintos genes *tsh*, *pap*, *icu* e *iss* se encuentran en mayor proporción en los aislados patógenos de *E. coli* que en los aislados de aves sanas. Esto se pudo apreciar en el presente estudio donde la combinación de *iss* y *tsh* fue la que se presentó en mayor proporción (17.34%), y la presencia de estos se encontró en un 90.48% de las cepas virulentas, mientras que sólo el 12.24% de las cepas no virulentas presentaron la combinación *ipaH-tsh*. La presencia de *ipaH* fue previamente reportado por Rosario *et al.*⁵³ quienes determinaron la presencia de este gen en 68 cepas patógenas de *E. coli* mediante la técnica de hibridación de ADN; sin embargo, en el presente estudio los resultados obtenidos mostraron que solamente ocho cepas fueron positivas de las 68 previamente identificadas

como portadoras del gen. Posiblemente esto se debe a la ausencia del plásmido *plnv* que codifica para *ipaH*⁷⁶, pues al ser un elemento móvil de ADN que la bacteria no requiere para su supervivencia puede perderse^{30,39}. Otra característica fue la presencia del *cdtB* sólo en cepas virulentas (33.33%); sin embargo, este hallazgo no indica que *cdtB* esté implicado directamente con la virulencia, pues todas las cepas positivas a éste gen también fueron positivas a *tsh* e *iss*, que se encuentran más relacionados con la virulencia de las cepas patógenas aviares de *E. coli*^{32,33,67,69,72}. No obstante, hacen falta más pruebas para comprobar si en verdad *cdtB* está implicado directamente en la virulencia o si existe una sinergia entre estos genes para poder desarrollar el cuadro clínico que se observa en las aves afectadas.

Como ya se mencionó, varios autores afirman que la presencia de *iss*, y *tsh* se han encontrado en mayor proporción en aves enfermas que en aves aparentemente sanas^{32,37,39} y que estos genes pueden ser encontrados en un plásmido que codifica para la producción de aerobactina y Col V.^{32,33,56,67,69,72,77} Estos estudios reportan que la virulencia de las cepas de *E. coli* aviares está ligada a la producción de la colicina Col V, ya que se encuentran en un plásmido que también posee otros factores de virulencia, así como para la resistencia a ciertos antimicrobianos. En el presente estudio, se observó que la virulencia se encontró ligada en un porcentaje mayor con la producción de colicinas diferentes a Col V (ver cuadro 8); lo que podría estar relacionado a lo reportado por Stehling *et al.*¹⁰ quienes mencionan que los genes que codifican para otro tipo de colicinas diferentes a Col V, también se sitúan en plásmidos capaces de portar otros genes de virulencia, así como resistencia a diversos antibióticos. Sin embargo, se requieren de más estudios para determinar la posible presencia y composición de estos plásmidos entre las cepas mexicanas causantes de colibacilosis aviar. En el presente estudio se corroboró que la prueba de letalidad en embriones de pollo es una herramienta útil que permite distinguir los aislamientos virulentos y no virulentos de *E. coli* en aves. Así mismo, se encontró una relación entre la virulencia y la presencia de los genes *iss* y *tsh* que codifican para la supervivencia aumentada en suero (*Iss*) y para la hemaglutinina termosensible (*Tsh*), respectivamente; lo que sugiere que estos

genes pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de la infección de aves jóvenes, por lo que podrían ser utilizados como marcadores en el diagnóstico y la detección de cepas patógenas aviares de *E. coli* en México asociadas a la mortalidad temprana en pollito. No obstante, se requieren más estudios para esclarecer la manera en que estos factores participan en la patogenia de la colibacilosis, así como comparar las características halladas en estas cepas, con las que poseen aquellas aisladas de otros procesos patológicos causados por cepas de *E. coli* en aves.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren una relación entre la virulencia de las cepas y la presencia de los genes *iss* y *tsh* que codifican para la supervivencia aumentada en suero (*Iss*) y para la hemaglutinina termosensible (*Tsh*), respectivamente.

Se encontró que la presencia del gen *ipaH* fue del 6.36% y más de la mitad de cepas fueron no virulentas, a diferencia de lo reportado en estudios previos en México, en los cuales sugieren que *ipaH* está relacionado con la cepas patógenas de *E. coli* aviar.

El presente estudio sugiere que la presencia de *iss*, *tsh*, *irp2*, y *cdtB* pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de la infección de aves jóvenes, por lo que podrían ser utilizados como marcadores en el diagnóstico y la detección de cepas patógenas aviares de *E. coli* en México.

PERSPECTIVAS

A pesar de que los resultados del presente estudio sugieren una relación entre la virulencia y la presencia de *iss* y *tsh*, es necesario realizar estudios adicionales para conocer si éstos se están expresando; asimismo, sería conveniente la búsqueda de otros genes reportados en cepas APEC, para analizar el papel que juegan en la patogenia de la colibacilosis.

De igual manera, sería importante poder determinar la interacción de los distintos genes; para esclarecer la manera en que estos participan en la presentación de la enfermedad clínica en las aves.

Debido a la importancia de la colibacilosis en la industria avícola, es primordial conocer la relación filogenética de estas cepas, para establecer la asociación existente entre los distintos aislamientos, determinar el momento de infección, y en consecuencia, dirigir de una manera más certera las medidas de prevención para esta enfermedad.

LISTA DE CUADROS

pág.

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores utilizados para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de genes de virulencia característicos del grupo APEC.	29
Cuadro 2. Relación de serogrupos de 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.	30
Cuadro 3. Relación de la presencia y combinación de genes de 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.	31
Cuadro 4. Relación de serogrupo y virulencia de 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.	32
Cuadro 5. Correlación de serogrupos específicos ordenados de acuerdo a su virulencia de 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.	33
Cuadro 6. Presencia de genes característicos del grupo APEC relacionados con la virulencia observada en 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.	34
Cuadro 7. Correlación de las distintas combinaciones de genes característicos del grupo APEC ordenadas de acuerdo a su virulencia de 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.	35
Cuadro 8. Correlación de virulencia y producción de colicinas observada en 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.	36

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Porcentaje de virulencia de 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.	37
Figura 2. Relación de embriones muertos por día en la prueba de letalidad embrionaria en 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda.	37
Figura 3. Productos de PCR para muestras de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México; iniciadores <i>iucD</i> , <i>irp2</i> , <i>cdtB</i> .	38
Figura 4. Productos de PCR para muestras de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México; iniciadores <i>tsh</i> , <i>ipaH</i>	39
Figura 5. Productos de PCR para muestras de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México; iniciador <i>iss</i>	40
Figura 3. Proporción de genes en 173 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.	41

Cuadro 8. Secuencias de iniciadores utilizados para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de genes de virulencia característicos del grupo APEC.

GEN	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA 5' – 3'	PRODUCTO AMPLIFICADO (pb)	REF
<i>tsh</i>	Hemaglutinina sensible a temperatura	GGGAAATGACCTGAATGCTGGCTTCCGCCGC TCATCAGTCAGTACCAC	420	60
<i>iss</i>	Supervivencia aumentada en suero	GTGGCGAAAAC TAGTAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	760	60
<i>irp2</i>	Proteína de captura de hierro	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC AACTCCTGATACAGGTGGC	413	61
<i>iucD</i>	Aerobactina	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC CCTGATCCAGATGATGCTC	714	61
<i>cdtB</i>	Toxina de distensión citoletal	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA	430	62
<i>ipaH</i>	Mecanismo enteroinvasivo	G TTCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	600	63

pb= pares de bases, REF = Referencia

Cuadro 9. Relación de serogrupos de 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.

SEROGRUPO	NÚMERO (%)
O?	27 (15.61%)
O2	22 (12.72%)
OR	14 (8.09%)
O20	11 (6.36%)
O100	8 (4.62%)
O8	8 (4.62%)
O131	7 (4.05%)
O84	6 (3.47%)
O25	5 (2.89%)
O78	5 (2.89%)
O88	4 (2.31%)
O6	4 (2.31%)
O123	4 (2.31%)
O7	4 (2.31%)
O128	3 (1.73%)
O86	3 (1.73%)
O16	2 (1.16%)
O129	2 (1.16%)
O167	2 (1.16%)
O85	2 (1.16%)
O152	2 (1.16%)
O19	2 (1.16%)
O153	2 (1.16%)
O103	2 (1.16%)
O93	2 (1.16%)
O34	2 (1.16%)
O155	2 (1.16%)
O112	2 (1.16%)
O48	1 (0.58%)
O3	1 (0.58%)
O127	1 (0.58%)
O125	1 (0.58%)
O81	1 (0.58%)
O141	1 (0.58%)
O118	1 (0.58%)
O165	1 (0.58%)
O166	1 (0.58%)
O4	1 (0.58%)
O146	1 (0.58%)
O79	1 (0.58%)
O22	1 (0.58%)
O9	1 (0.58%)

NÚMERO = # de cepas

(%) = porcentaje total

O?= sin reacción con ninguno de los antisueros del esquema

OR= reacción inespecífica contra todos los antisueros

Cuadro 10. Relación de la presencia y combinación de genes de 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.

COMBINACIÓN DE GENES	NÚMERO (%)
<i>tsh,iss</i>	30 (17.34%)
<i>iucD</i>	18 (10.40%)
<i>tsh</i>	18 (10.40%)
<i>iucD,cdtB,irp2,tsh,iss</i>	17 (9.83%)
<i>iucD,irp2,tsh,iss</i>	12 (6.94%)
<i>iss</i>	11 (6.36%)
<i>cdtB,irp2,tsh,iss</i>	11 (6.36%)
<i>ipaH,tsh</i>	7 (4.05%)
<i>iucD,tsh,iss</i>	4 (2.31%)
<i>iucD,tsh</i>	3 (1.73%)
<i>iucD,irp2,iss</i>	3 (1.73%)
<i>iucD,irp2,ipaH,tsh,iss</i>	3 (1.73%)
<i>iucD,iss</i>	1 (0.58%)
<i>irp2,tsh,iss</i>	1 (0.58%)
<i>irp2,tsh</i>	1 (0.58%)
<i>irp2,iss</i>	1 (0.58%)
<i>irp2</i>	1 (0.58%)
<i>ipaH,tsh,iss</i>	1 (0.58%)
(-)	30 (17.34%)

(-) = cepas negativas
 NÚMERO = # de cepas
 (%) = porcentaje total

Cuadro 11. Relación de serogrupo y virulencia de 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.

SEROGRUPO	VIRULENCIA			NÚMERO (%)
	V	MV	NV	
O?	9	7	11	27 (15.61%)
O2	17	4	1	22 (12.72%)
OR	3	2	9	14 (8.09%)
O20	7	3	1	11 (6.36%)
O100	2	2	4	8 (4.62%)
O8	2	1	5	8 (4.62%)
O131	5		2	7 (4.05%)
O84	5	1		6 (3.47%)
O25	5			5 (2.89%)
O78	2	2	1	5 (2.89%)
O123	2	2		4 (2.31%)
O6	2	1	1	4 (2.31%)
O88	2	1	1	4 (2.31%)
O7	1	2	1	4 (2.31%)
O128	2	1		3 (1.73%)
O86	1	1	1	3 (1.73%)
O129	2			2 (1.16%)
O16	2			2 (1.16%)
O85	2			2 (1.16%)
O153	1	1		2 (1.16%)
O93	1		1	2 (1.16%)
O34		2		2 (1.16%)
O167	2			2 (1.16%)
O152	1	1		2 (1.16%)
O103	1	1		2 (1.16%)
O19	1	1		2 (1.16%)
O112			2	2 (1.16%)
O155			2	2 (1.16%)
O127	1			1 (0.58%)
O3	1			1 (0.58%)
O48	1			1 (0.58%)
O141		1		1 (0.58%)
O22		1		1 (0.58%)
O4		1		1 (0.58%)
O166			1	1 (0.58%)
O79			1	1 (0.58%)
O125	1			1 (0.58%)
O81		1		1 (0.58%)
O118			1	1 (0.58%)
O146			1	1 (0.58%)
O165			1	1 (0.58%)
O9			1	1 (0.58%)

V = cepas virulentas
MV = cepas moderadamente virulentas
NV = cepas no virulentas

NÚMERO = # de cepas
(%) = porcentaje total

Cuadro 12. Correlación de serogrupos específicos ordenados de acuerdo a su virulencia de 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.

	SEROGRUPO	VIRULENCIA			NÚMERO (%)
		V	MV	NV	
V	O25	5			5 (2.89%)
	O85	2			2 (1.16%)
	O167	2			2 (1.16%)
	O16	2			2 (1.16%)
	O129	2			2 (1.16%)
	O48	1			1 (0.58%)
	O3	1			1 (0.58%)
	O127	1			1 (0.58%)
	O125	1			1 (0.58%)
MV	O34		2		2 (1.16%)
	141		1		1 (0.58%)
	O22		1		1 (0.58%)
	O4		1		1 (0.58%)
	O81		1		1 (0.58%)
NV	O112			2	2 (1.16%)
	O118			1	1 (0.58%)
	O146			1	1 (0.58%)
	O155			2	1 (1.16%)
	O165			1	1 (0.58%)
	O166			1	1 (0.58%)
	O79			1	1 (0.58%)
	O9			1	1 (0.58%)
V, MV	O84	5	1		6 (3.47%)
	O123	2	2		4 (2.31%)
	O128	2	1		3 (1.73%)
	O19	1	1		2 (1.16%)
	O153	1	1		2 (1.16%)
	O152	1	1		2 (1.16%)
	O103	1	1		2 (1.16%)
V, NV	O131	5		2	7 (4.05%)
	O93	1		1	2 (1.16%)
V, MV, NV	O2	17	4	1	22 (12.72%)
	O?	9	7	11	27 (15.61%)
	O20	7	3	1	11 (6.36%)
	OR	3	2	9	14 (8.09%)
	O78	2	2	1	5 (2.89%)
	O100	2	2	4	8 (4.62%)
	O88	2	1	1	4 (2.31%)
	O8	2	1	5	8 (4.62%)
	O6	2	1	1	4 (2.31%)
	O7	1	2	1	4 (2.31%)
	O86	1	1	1	3 (1.73%)

V = cepas virulentas

MV = cepas moderadamente virulentas

NV = cepas no virulentas

NÚMERO = # de cepas

(%) = porcentaje total

Cuadro 13. Presencia de genes característicos del grupo APEC relacionados con la virulencia observada en 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.

GENES	PORCENTAJE DE ACUERDO A SU VIRULENCIA		
	V %	MV %	NV %
<i>iucD</i>	46.43%	25.00%	24.49%
<i>cdtB</i>	33.33%		
<i>irp2</i>	55.95%	5.00%	2.04%
<i>ipaH</i>	3.57%	5.00%	12.24%
<i>tsh</i>	94.05%	45.00%	22.45%
<i>iss</i>	96.43%	27.50%	6.12%
(-)		20.00%	44.90%

V % = porcentaje de cepas virulentas

MV % = porcentaje de cepas moderadamente virulentas

NV % = porcentaje de cepas no virulentas

(-) = cepas negativas

Cuadro 14. Correlación de las distintas combinaciones de genes característicos del grupo APEC ordenadas de acuerdo a su virulencia de 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.

COMBINACIÓN DE GENES	NÚMERO (%)
CEPAS VIRULENTAS	
<i>tsh,iss</i>	30 (35.71%)
<i>iucD,cdtB,irp2,tsh,iss</i>	17 (20.24%)
<i>iucD,irp2,tsh,iss</i>	12 (14.29%)
<i>cdtB,irp2,tsh,iss</i>	11 (13.10%)
<i>iucD,irp2,ipaH,tsh,iss</i>	3 (3.57%)
<i>iucD,irp2,iss</i>	3 (3.57%)
<i>iucD,tsh,iss</i>	2 (2.38%)
<i>tsh</i>	2 (2.38%)
<i>irp2,tsh,iss</i>	1 (1.19%)
<i>iss</i>	1 (1.19%)
<i>iucD,iss</i>	1 (1.19%)
<i>iucD,tsh</i>	1 (1.19%)
CEPAS MODERADAMENTE VIRULENTAS	
<i>tsh</i>	11 (27.50%)
<i>iss</i>	7 (17.50%)
(-)	8 (20.00%)
<i>iucD</i>	6 (15.00%)
<i>iucD,tsh,iss</i>	2 (5.00%)
<i>iucD,tsh</i>	2 (5.00%)
<i>irp2,tsh</i>	1 (2.50%)
<i>irp2iss</i>	1 (2.50%)
<i>ipaH,tsh,iss</i>	1 (2.50%)
<i>ipaH,tsh</i>	1 (2.50%)
CEPAS NO VIRULENTAS	
(-)	22 (44.90%)
<i>iucD</i>	12 (24.49%)
<i>ipaH,tsh</i>	6 (12.24%)
<i>tsh</i>	5 (10.20%)
<i>iss</i>	3 (6.12%)
<i>irp2</i>	1 (2.04%)

(-) = cepas negativas

NÚMERO = # de cepas

(%) = porcentaje total por grupo de virulencia

Cuadro 8. Correlación de virulencia y producción de colicinas observada en 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México.

VIRULENCIA	COLICINAS	NÚMERO (%)
V	COL V	7 (8.33%)
	COLV Y OTRAS COLICINAS	29 (34.52%)
	OTRAS COLICINAS	28 (33.33%)
	NO COLICINAS	15 (17.86%)
	ND	5 (5.95%)
MV	COL V	6 (15.00%)
	COLV Y OTRAS COLICINAS	10 (25.00%)
	OTRAS COLICINAS	11 (27.50%)
	NO COLICINAS	12 (30.00%)
	ND	1 (2.50%)
NV	COL V	5 (10.20%)
	COLV Y OTRAS COLICINAS	12 (24.49%)
	OTRAS COLICINAS	9 (18.37%)
	NO COLICINAS	22 (44.90%)
	ND	1 (2.04%)

V = cepas virulentas

MV = cepas moderadamente virulentas

NV = cepas no virulentas

COL V = colicina CoIV

OTRAS COLICINAS = cualquier colicina diferente a CoIV

NO COLICINAS = sin producción de colicinas

ND = no determinadas

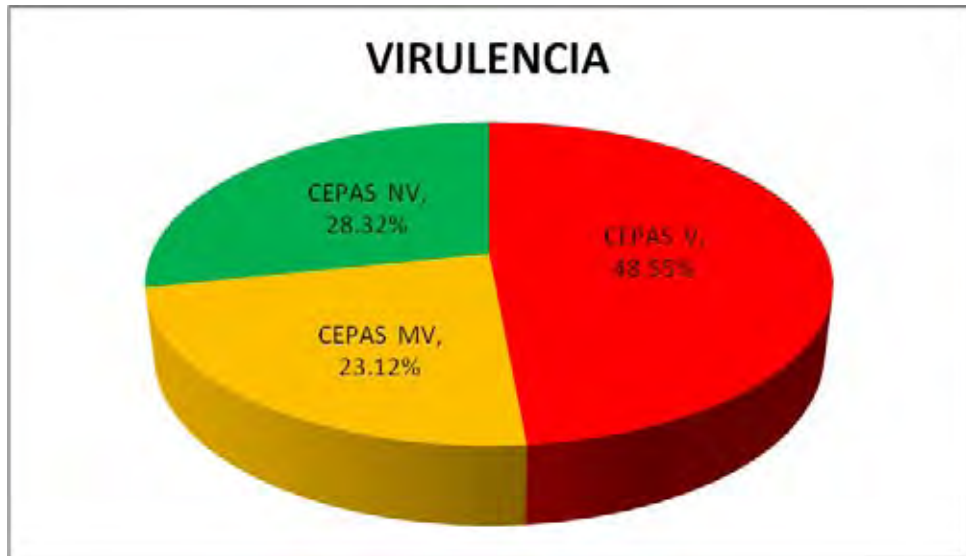


Figura 4. Porcentaje de virulencia de 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México. V = cepas virulentas; MV = cepas moderadamente virulentas; NV = cepas no virulentas.

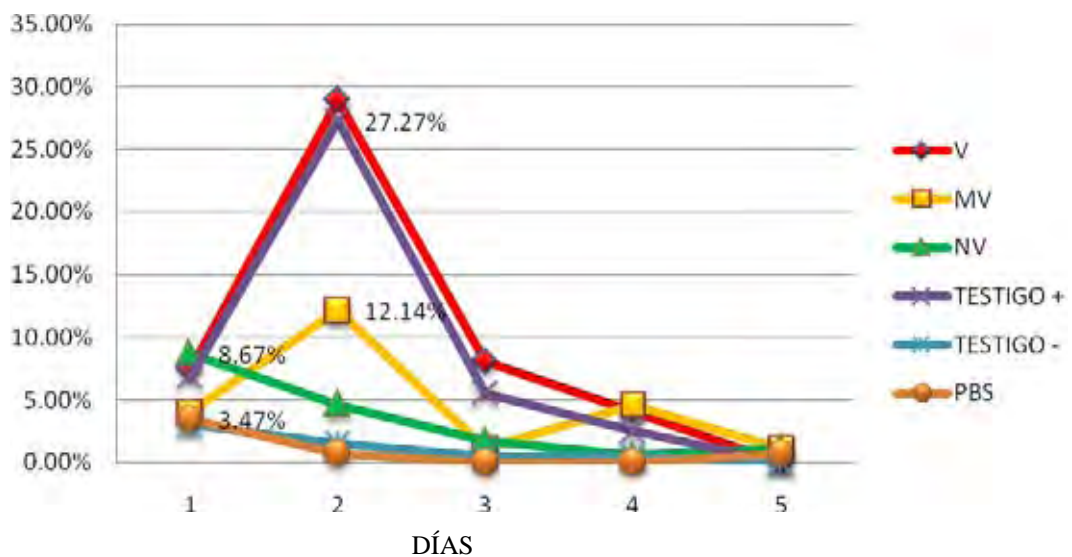


Figura 5. Relación de embriones muertos por día en la prueba de letalidad embrionaria en 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda. V = cepas virulentas; MV = cepas moderadamente virulentas; NV = cepas no virulentas; TESTIGO + = cepa virulenta O1; TESTIGO - = cepa no virulenta K-12; PBS = testigo negativo PBS estéril

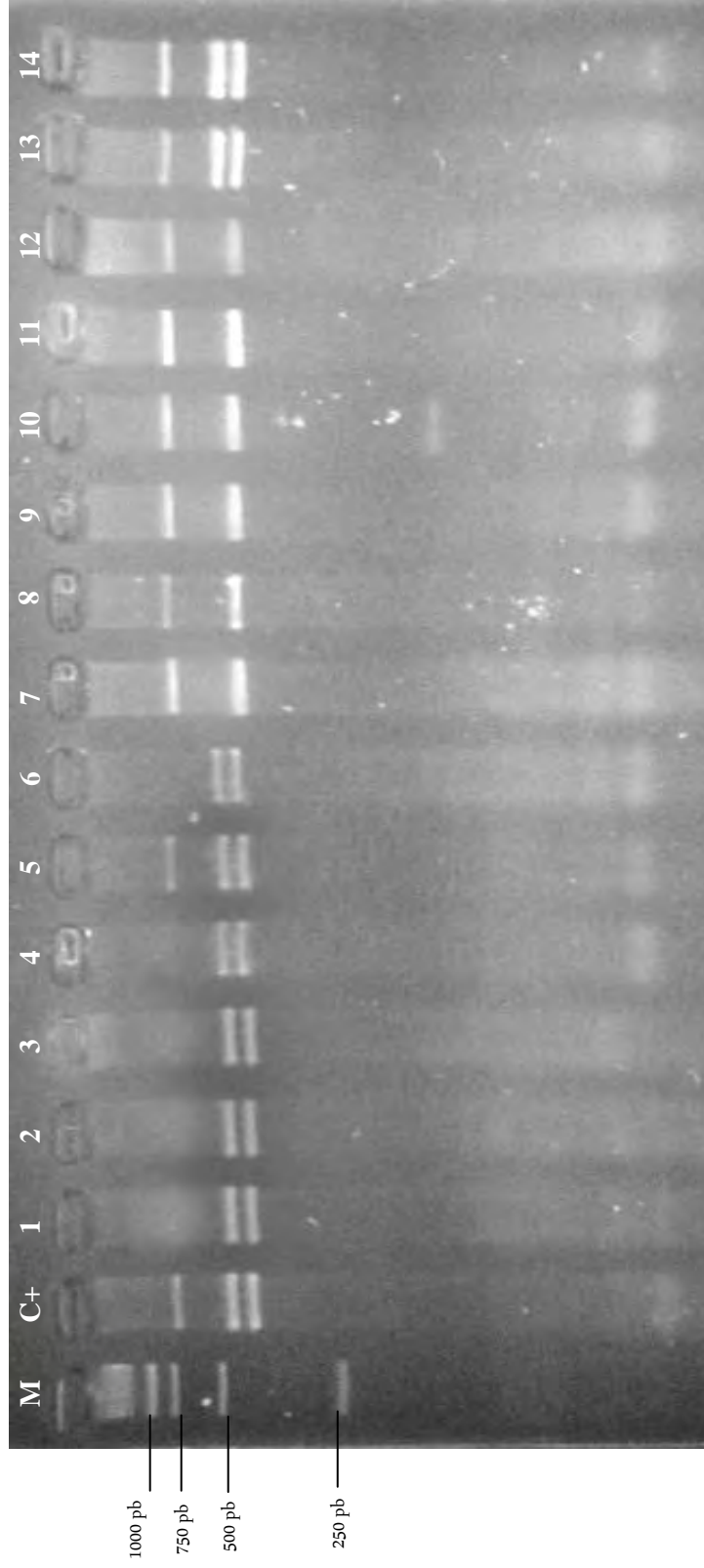


Figura 3. Productos de PCR para muestras de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México; iniciadores *iucD*, *irp2*, *cdtB*.

En gel de agarosa al 3%. En carril M se encuentra el marcador DNA Ladder de 250 pb (DNA ladder INVITROGEN®).

Testigo positivo línea C+ mezcla de genes (*iucD* 714pb, *cdtB* 430pb, *irp2* 413pb).

Líneas 1, 2, 3, 4, 6 cepas positivas a *cdtB*, *irp2*; líneas 5,13, 14 cepas positivas a *iucD*, *cdtB*, *irp2*; líneas 7, 8, 9, 10, 11, 12 cepas positivas *iucD*, *irp2*.

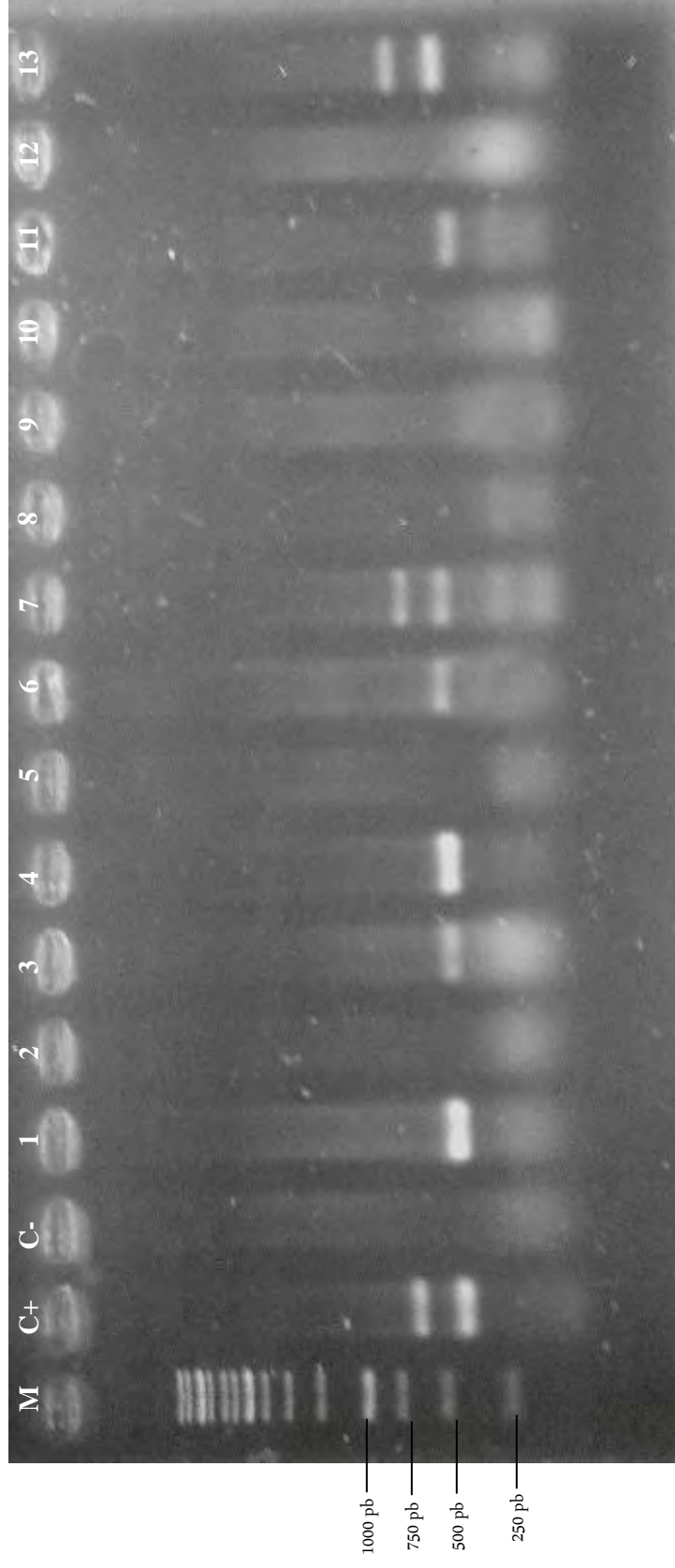


Figura 4. Productos de PCR para muestras de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México; iniciadores *tsh*, *ipaH*

En gel de agarosa al 1%. En carril M se encuentra el marcador DNA Ladder de 250 pb (DNA ladder INVITROGEN®).

Testigo positivo línea C+ mezcla de genes (*tsh* 420pb y *ipaH* 600pb). Testigo negativo línea C-

Líneas 1, 3, 4, 6, 11 cepas positivas a *tsh*; líneas 7, 13 cepas positivas a *tsh*, *ipaH*; líneas 2, 5, 8, 9, 10, 12 cepas negativas.

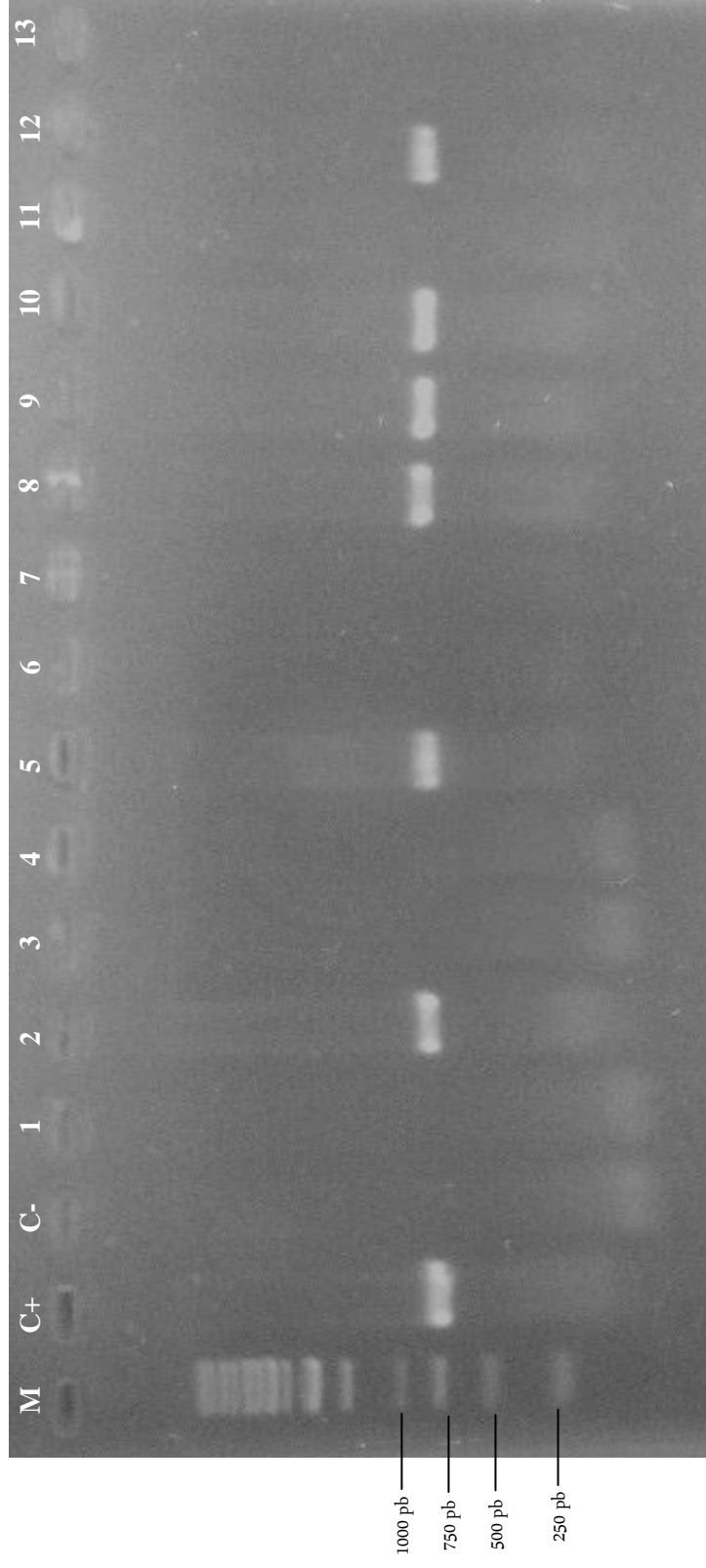


Figura 5. Productos de PCR para muestras de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México; iniciador *iss*

En gel de agarosa al 1%. En carril M se encuentra el marcador DNA Ladder de 250 pb (DNA ladder INVITROGEN®). Testigo positivo línea C+ gen (*iss* 760pb). Testigo negativo línea C- Líneas 2, 5, 8, 9, 10, 12 cepas positivas a *iss*; líneas 1, 3, 4, 6, 7, 11, 13 cepas negativas.

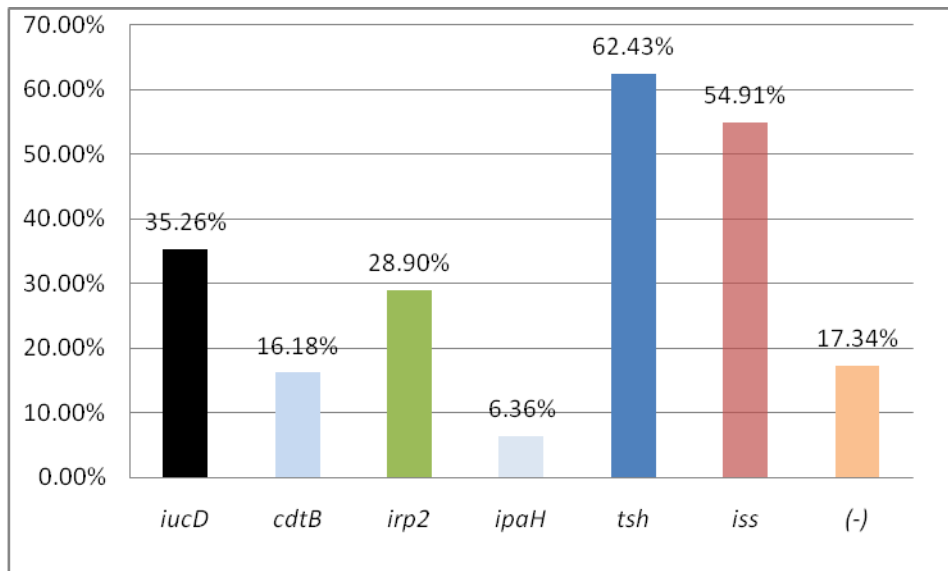


Figura 6. Proporción de genes en 173 cepas de *Escherichia coli* aisladas en una empresa integrada a partir de granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda en México. Genes: *tsh* (hemaglutinina sensible a temperatura), *iss* (supervivencia aumentada en suero), *irp2* (proteína de captura de hierro), *iucD* (aerobactina), *cdtB* (toxina de distensión citoletal), *ipaH* (mecanismo enteroinvasivo) (-) = cepas negativas a todos los genes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nicole T, Glasner V. *Escherichia coli* the organism. In: *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Edited by Michael Donnenberg. Ed. Academic Press. 2002:3-44.
2. Freeman BA. *Microbiología de Burrows*. 22a ed. México: Interamericana McGraw-Hill, 1989.
3. Jordan W, Pattison M. *Enfermedades de las aves*. 3a Edición: Manual moderno, 1998.
4. Orskov F, Orskov I, Evans DJ, Sack RB, Sack DA, Wadström T. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains. *Med Microbiol Immunol* 1976;162:73–80.
5. López AJ. *Escherichia coli: Mecanismos de patogenicidad*. En: Moreno CR editor. *Ciencia Veterinaria Vol. 1*. México: FMVZ, UNAM, 1976.
6. Landaverde OM. Aislamiento y tipificación de *Escherichia coli* del interior y exterior del huevo de gallina. UNAM-FMVZ. 1962.
7. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigen, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987;155:377-389.
8. Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. En: *Methods of microbiology Vol. 14*. London: T. Bergan. Academic Press, 1984;14:43–112.
9. Chansiripornchaia N, Ramasootab P, Sasipreeyajana J, Svensonc SB. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet Microbiol* 2001;80:75-83.
10. Stehling EG, Yano T, Brocchi M, Dias da Silveira W. Characterization of a plasmid-encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS). *Vet Microbiol* 2003;95:111-120.
11. Ewers C, Janben T, Kiebling S, Philipp H, Wieler HL. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol* 2004;104:91–101.

12. Delicado ER, Guimaraes de Brito B, Gaziri LJ, Vodotto MC. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol* 2003;94:97-103.
13. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* 1999;30:299-316.
14. Gibbs PS, Wooley RE. Comparison of the intravenous chicken challenge method with the embryo lethality assay for studies in avian colibacillosis. *Avian Dis* 2003;47:672-680.
15. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Jansen WH, García V, Vázquez ML, Blanco J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet Microbiol* 1998;61:229-235.
16. Dias da Silveira W, Ferreira A, Brocchi M, De Hollanda LM, Pestana de Castro AF, Tatsumi YA, Lancellotti M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* 2002;85:47-53.
17. Mellata M, Bakour R, Jacquemin E, Mainil JG. Genotypic and phenotypic characterization of potential virulence of intestinal avian *Escherichia coli* strains isolated in Algeria. *Avian Dis* 2001;45:670-679.
18. Ginns CA, Benham ML, Adams LM, Withear KG, Bettelheim KA, Crabb BS, Browning GF. Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infect Immun* 2000;68:1535-1541.
19. Gibbs PS, Maurer JJ, Nolan LK, Wooley RE. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of the increased serum survival gene cluster (*iss*). *Avian Dis* 2003;47:370-379.
20. Jeffrey JS, Nolan LK, Tonooka KH, Wolfe S, Giddings CW, Horne SM, Foley SL, Lynne AM, Ebert JO, Elijah LM, Bjorklund G, Pfaff-McDonough SJ, Singer RS, Doetkott C. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis* 2002;46:48-52.
21. Peighambari SM, Vaillancourt JP, Wilson RA, Gyles CL. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. *Avian Dis* 1994;39:116-124.

22. 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.
23. Quackenbush RL, and Falkow S. Relationship between colicin V activity and virulence in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1979;24:562–564.
24. Waters V, and Crosa J. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* 1991;55:437–450.
25. McPeake W, Smyth JA, Ball HJ. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet Microbiol* 2005;110:245–253.
26. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol* 1997;35:2953–2957.
27. Chuba P, Leon A, Banerje E, and Palchaudhuri S. Cloning and DNA sequence of plasmid determinant *iss*, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. *Mol Gen Genet* 1989;216:287–292.
28. Lynne AM, Foley SL, and Nolan LK. Immune response to recombinant *Escherichia coli* *Iss* protein in poultry. *Avian Dis* 2006;50:273–276.
29. Pfaff-McDonough S, Horne S, Giddings C, Ebert C, Doetkott, M, Smith and Nolan L. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis* 2000;44:23–33.
30. Johnson JT, Giddings WC, Horne MS, Gibbs PS, Wooley ER, Skyberg J, Sherwood SJ, Foley LS, and Nolan KL. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis* 2002;46:342–352.
31. Provence DL, and Curtiss R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 1994;62:1369–1380.

32. Maurer JJ, Brown TP, Steffens W, and Thayer S. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 1998;42:106–118.
33. Dozois C, Bree M, Fairbrother J, Desautels C, and Curtiss R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect Immun* 2000;68:4145–4154
34. Wandersman C, and Depelaire P. Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:611-647.
35. Dho M, and Lafont J. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. *Avian Dis* 1984;28:1016–1025.
36. Lafont JP, Dho M, D’Hauteville H, Bree A, and Sansonetti P. Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1987;55:193–197.
37. Ngeleka M, Brereton L, Brown G, and Fairbrother M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*- DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis* 2002;46:143–152.
38. Neilands JB. Mechanism and regulation of synthesis of aerobactina in *Escherichia coli* k12 (pColV-K30). *Can J Microbiol* 1992;38:728-733.
39. Tivendale KA, Allen JL, Ginns CA, Crabb B, and Browning G. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2004;72:6554-6560.
40. Johnson WM, and Lior H. Response of chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* possible misinterpretation as a heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol Lett* 1987;43:19–23.
41. Aragon V, Chao K, and Dreyfus A. Effect of cytolethal distending toxin on F-actin assembly and cell division in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun* 1997;65:3774–3780.
42. Peres Y, Marches O, Daigle F, Nougayrede P, Herault F, Tasca C, DeRycke J, and Oswald E. A new cytolethal distending toxin (CDT) from

Escherichia coli producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. Mol Microbiol 1997;24:1095–1107.

43. Ansaruzzaman M, Albert J, Nahar S, Byun R, Kataouli M, Kuhn I, and Molby R. Clonal groups of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in case-control studies of diarrhoea in Bangladesh. J Med Microbiol 2000;49:177–185.

44. Scott D, and Kaper J. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. Infect Immun 1994;62:244–251.

45. Pupo GM, Lan R, Reeves PR. Multiple independent origins of Shigella clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:10567-72.

46. Rosario CC, Puente LJ, Verdugo RA, Anderson RC, Eslava CC. Phenotypic Characterization of *ipaH+* *Escherichia coli* Strains Associated with Yolk Sac Infection. Avian Dis 2005;49:409-417.

47. Livermore M, James D, Reacher M, Graham C, Nichols T, Stephens P, Johnson P, and George R. Trends in fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in Enterobacteriaceae from bacteremias, England and Wales, 1990–1999. Emerg Infect Dis 2002;8:473–478.

48. Chaffer M, Heller ED, Schwartsburd B. Relationship between resistance to complements, virulence and outer membrane protein patterns in pathogenic *Escherichia coli* O2 isolates. Vet Microbiol 1999;64:323-332.

49. Gibbs PS, Petermann AR, Wooley RE. Comparison of several Challenge Models for Studies in Avian Colibacillosis. Avian Dis 2004;48:751-758.

50. Powell C, and Finkelstein R. Virulence of *Escherichia coli* strains for chick embryos. J Bacteriol 1966;91:1410–1417.

51. Nolan L, Wooley R, Brown J, Spears K, Dickerson H, and Dekich M. Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and the chicken lethality assay for determining virulence of avian *Escherichia coli*. Avian Dis 1992;36:395–397.

52. Wooley RE, Gibbs PS, Brown TP, Maurer JJ. Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. Avian Dis 2000;44:318-24.

53. 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.
54. Ramírez GB. Serotipificación y detección de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes muestras obtenidas en una empresa avícola integrada. (tesis licenciatura). México, D.F. FMVZ. UNAM, 2007.
55. Skyberg J, Shelley MH, Catherine W, Giddings RE, Wooley BP, Gibbs PS and Nolan L. Characterizing Avian *Escherichia coli* Isolates with Multiplex Polymerase Chain Reaction *Avian Dis* 2003;47:1441–1447.
56. Ewers C, Janben T, Kiebling S, Philipp H, And Wieler L. Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction *Avian Dis* 2005;49:269–273.
57. Rodriguez-siek K, Giddings K, Doetkott C, Johnson T, Nolan L. Characterizing the APEC pathotype *Vet Res* 2005;36:241–256.
58. Aranda K, Fagundes-Neto U, and Scaletsky S. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol* 2004;62:5849–5853.
59. Gross WG, Gyles CL. Diseases due *Escherichia coli* in poultry. In: *Escherichia coli* in domestic animals and human, Cab International ed., Wallingford. 1994:237-259.
60. Kariyawasam S, Johnson TJ, DebRoy C and Nolan L. Occurrence of Pathogenicity Island IAPEC-O1 Genes Among *Escherichia coli* Implicated in Avian Colibacillosis. *Avian Dis* 2006;50:405–410.
61. Allan BJ, Van Den Hurk JV, Potter AA. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Can J Vet Res* 1993;57:146-151.
62. Ike K, Kume K, Kawahara K, Danbara H. Serotyping of O and pillus antigens of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with coli-septicemia. *Jpn J Vet Sci* 1990;52:1023-1027.
63. Yaguchi K, Ogitani T, Osawa R, Kawano M, Kokumai N, Kaneshige T, Noro T, Masubuchi K, and Shimizu Y. Virulence Factors of Avian Pathogenic

Escherichia coli Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Japan. Avian Dis 2007;51:656–662.

64. Ozawa M, Harada K, Kojima A, Asai T, Sameshima T. Antimicrobial Susceptibilities, Serogroups, and Molecular Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates in Japan. Avian Dis 2008;52:392–397.

65. Zhao S, Maurer JJ, Hubert S, De Villena JF, McDermott FP, Meng J, Ayers S, White GD. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Vet Microbiol 2005;107:215–224.

66. Cloud SS, Rosenberger JK, Fries PA, Wilson RA, Odor EM. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes metabolic activity, antibiotic sensitivity. Avian Dis 1985;29:1084-1093.

67. Montgomery R, Jones L, Boyle C, Luo Y, Boyle J. The Embryo Lethality of *Escherichia coli* Isolates and Its Relationship to Various In Vitro Attributes. Avian Dis 2005;49:63–69.

68. Dozois CM, Fairbrother, JM, Harel J, Boss J. Pap- and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. Infect. Immun 1992;60:2648-2656.

69. Delicato RE, Guimarães de Brito B, Gaziri J, Vidotto C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. Vet Microbiol 2003;94:97–103.

70. Mellata M, Dho-Moulin, Dozois M, Curtiss R, Brown P, Arne P, Bree A, Desautels D, and Fairbrother M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. Infect Immun 2003;71:536–540.

71. Ngeleka M, Kwaga J, White D, Whittam T, Riddell C, Goodhope R, Potter A, and Allan B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. Infect Immun 1996;64:3118–3126.

72. Parreira V, and Gyles C. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. Infect Immun 2003;71:5087–96.

73. Vandekerchove D, Vandemaele F, Adriaensen C, Zaleska M, Hernalsteens J, De Baets, Butaye P, Van Immerseel. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: Comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet Microbiol* 2005;108:75–87.
74. Giovanardi D, Campagnari E, Sperati Ruffoni, Pesente P, Ortol R, and Furlattini V. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian Pathology* 2005;34:313-318.
75. Ewers C, Antão EM, Diehl I, Philipp HC, Wieler LH. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:184-92.
76. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex* 2002;44:464-475.
77. Nolan L, Giddings C, Horne SM, Doetkott C, Gibbs PS, Wooley RE, Foley SL. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of *iss* and the virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 2002;46:386-92.