



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**RELACIÓN ENTRE GRUPO FILOGENÉTICO Y GENES  
ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA EN CEPAS DE *Escherichia  
coli* AISLADAS DE AVES CON DIFERENTE CUADRO CLÍNICO**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
ELIZABETH LÓPEZ ACEVEDO

TUTOR PRINCIPAL: CECILIA ROSARIO CORTÉS  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
UNAM

COMITÉ TUTOR:  
MARÍA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS  
UNIDAD DE HEMATOLOGÍA E INVESTIGACIÓN  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D. F.

ENERO 2015



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.

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN230811), de la DGAPA, por el apoyo financiero para realizar el trabajo de investigación.

A CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) 492580/283519 por el respaldo que otorga a los estudiantes que ingresan a la maestría y de esta forma poder realizar las metas fijadas con entera tranquilidad.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el estímulo que otorga a los estudiantes de maestría para la conclusión del proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, institución que me permitió ampliar la visión en diferentes ámbitos gracias a las diferentes actividades que se imparten.

A la Dra. Cecilia Rosario Cortés quien me formó a través de darme la oportunidad de participar en el proyecto con su grupo de investigación.

Al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos ya que me compartió sus conocimientos.

Al Dr. Ulises Hernández Chiñas quien me apoyó para el diseño de iniciadores.

A la Dra. Rosario Morales Espinosa quien me apoyó en la búsqueda de las condiciones para la amplificación de los genes de virulencia.

A Lulú Estrada, quien tuvo para mi palabras de aliento.

A la Dra. Socorro Magdalena Escorcia Martínez a quien agradezco su apoyo para las estrategias moleculares.

Al Dr. Jaime Alonso Navarro Hernández quien me brindo apoyo en el análisis estadístico.

Al Dr. Nestor Ledesma Martínez quien me facilitó el equipo que me permitió realizar mis experimentos.

A todos, muchísimas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	V
ABSTRACT .....	VI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	10
3. HIPÓTESIS .....	11
4. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.....	11
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
5.1. Cepas bacterianas .....	12
5.2. Identificación de <i>Escherichia coli</i> .....	13
5.3. Selección y diseño de genes de virulencia .....	13
5.4. Detección de genes de virulencia .....	15
5.5. Detección de grupos filogenéticos .....	15
5.5. Análisis estadístico .....	18
6. RESULTADOS .....	19
6.1. Detección de genes asociados con la virulencia.....	19
6.2. Grupos filogenéticos.....	24
7. DISCUSIÓN .....	32
8. CONCLUSIONES .....	41
9. ABREVIATURAS Y SIGLAS .....	42
10. BIBLIOGRAFÍA.....	45

## LISTA DE FIGURAS

1.1.	Amplificado para las secuencias de los genes de virulencia.....	19
1.2.	Gráfica en la que se muestra la asociación entre los genes de virulencia en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de dos cuadros clínicos .....	21
1.3.	Análisis de correspondencia para la relación entre las variables genes de virulencia y serogrupo .....	22
1.4.	Amplificado para las secuencias de los grupos filogenéticos.....	25
1.5.	Frecuencia de cepas positivas en infección de saco vitelino y peritonitis así como en el grupo filogenético .....	26
1.6.	Análisis de correspondencia para los grupos filogenéticos y cada patología (ISV y Peritonitis).....	27
1.7.	Frecuencias observadas a partir del análisis entre grupos filogenéticos y los serogrupos O82, O25 de pollitas con ISV y O25, O2 de gallinas con peritonitis.....	28
1.8.	Análisis de correspondencia para la relación entre grupo filogenético y los serogrupos O82, O25p de ISV y O25g, O2 de peritonitis .....	29
1.9.	Asociación de las variables genes de virulencia, grupo filogenético B2 y serogrupo O25p de ISV y O25g de peritonitis con las granjas de las que se obtuvieron las muestras analizadas .....	30
1.10.	Asociación de las variables genes de virulencia, grupo filogenético D y el serogrupo O25p de ISV y O25g de peritonitis con las granjas de las que se obtuvieron las muestras analizadas .....	31

## LISTA DE CUADROS

1.1. Cepas de <i>E. coli</i> aisladas a partir de pollitas de remplazo con infección de saco vitelino y gallinas con peritonitis pertenecientes al trabajo de Cruz <i>et al.</i> , 2012 .....	12
1.2. Secuencias utilizadas para la amplificación de diferentes genes relacionados con la virulencia de <i>Escherichia coli</i> patógena aviar (APEC) .....	14
1.3. Iniciadores utilizados para amplificar las secuencias de los grupos filogenéticos a través del ensayo de PCR en cepas de <i>E. coli</i> aisladas a partir de infección de saco vitelino y peritonitis .....	17
1.4. Presencia de los diferentes genes relacionados con la virulencia de cepas APEC aislados de infección de saco vitelino y peritonitis .....	20
1.5. Asociación de las 16 combinaciones observadas en los genes de virulencia con los serogrupos O82, O25 de pollitas con ISV y O25, O2 aislados de gallinas con peritonitis .....	23
1.6. Grupos filogenéticos de cepas APEC aisladas de aves con infección de saco vitelino y peritonitis .....	24

## RESUMEN

La infección del saco vitelino (ISV) y la peritonitis son padecimientos causados por *Escherichia coli* patógeno aviar (APEC); sin embargo en el caso de peritonitis se desconoce cuál es el origen, aunque existen varias hipótesis. El objetivo del presente trabajo fue conocer si existe alguna relación entre los aislados obtenidos de ISV y peritonitis, para esto se hizo la caracterización molecular de *Escherichia coli* aisladas de aves afectadas por ambas patologías. Se realizó un estudio con 125 aislados de APEC, 54 de pollitas de reemplazo con ISV y 71 de gallinas con peritonitis de la misma parvada. Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo a los serogrupos predominantes en ISV (O82 y O25) y peritonitis (O2 y O25). Se obtuvo el DNA de los aislados por el método de ebullición para la amplificación de los genes *iss*, *irp2*, *cdtB*, *ipaH*, *iucD* y *tsh* por medio de PCR; además se amplificaron los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de DNA TspE4.C2 para definir la filogenia. Los resultados mostraron en las cepas aisladas de ISV; la presencia de *irp2-iucD*, genes relacionados con la captación de hierro en combinación con *iss*, gen relacionado a resistencia al suero. En peritonitis se observó la presencia de *irp2-tsh-iss*, genes que se encuentran más asociados con la adherencia y evasión del complemento ( $P < 0.05$ ). El análisis filogenético mostró que el 97% de las cepas APEC estudiadas pertenecen a los grupos B2 y D. El serogrupo O25 presente en ambas patologías mostró la amplificación de *iucD*, *irp2*, *iss* en un mayor porcentaje en las cepas aisladas de peritonitis (4% ISV, 8% peritonitis). Los resultados mostraron que las cepas APEC aisladas de ambas patologías presentan características fenotípicas y genotípicas similares. Sin embargo, se requiere realizar otros estudios para definir si ambos grupos de cepas están relacionadas clonalmente.

Palabras clave: APEC, infección de saco vitelino, peritonitis, filogenia, genes de virulencia.

## ABSTRACT

Yolk sac infection (ISV) and peritonitis are diseases caused by pathogenic avian *Escherichia coli* (APEC); however in the case of peritonitis is unknown what the origin, although there are several hypotheses. The aim of this study was to determine whether there is any relationship between isolates obtained from ISV and peritonitis, for this was made of characterization molecular of *Escherichia coli* aisles of birds affected by both diseases. To this end, a study of 125 isolates of APEC, 54 replacement pullet ISV and 71 hens with peritonitis in the same flock was performed. The strains were selected according to prevailing ISV serogroups (O82 and O25) and peritonitis (O2 and O25). DNA isolated by the boiling method for the amplification of the gene *iss*, *irp2*, *cdtB*, *ipaH*, *tsh* and *iucD* by PCR was obtained; plus the *chua*, *yjaA* and the DNA fragment TspE4.C2 to define the phylogeny genes were amplified. The results showed in ISV isolates; the presence of *irp2-iucD*, genes related to iron uptake in combination with *iss*, gene related to serum resistance. In the presence of peritonitis *irp2-tsh-iss*, genes that are more associated with adherence and evasion of complement (P <0.05) was observed. Phylogenetic analysis showed that 97% of APEC strains studied belong to the groups B2 and D. The serogroup O25 present in both conditions showed amplification of *iucD*, *irp2*, *iss* a higher percentage of isolates peritonitis (4% ISV, 8% peritonitis). The results showed that isolates APEC both disorders similar genotypic and phenotypic characteristics. However, further studies are required to determine whether both groups of strains are clonally related.

Keywords: APEC, Yolk Sac Infection, Peritonitis, Phylogeny, Virulence Genes.

## INTRODUCCIÓN

La avicultura nacional constituye una actividad económica de gran importancia, ya que la producción de huevo en el 2013 fue de 2,509,350 toneladas, lo que generó 1,175,000 empleos directos e indirectos; por ello, se ha destacado como la principal industria transformadora de proteína vegetal en proteína animal. Por otro lado, el consumo *per capita* de huevo en el 2013 fue de 21.7 kg y se pronostica que al cierre del 2014 la producción de huevo se incrementará 2 por ciento, para llegar a 2,559,537 toneladas. Gracias a ello, la industria avícola crecerá 1.7 por ciento este año, con lo que el país se convertiría en el quinto productor de huevo, aunado a que se generarán alrededor de 1.2 millones de empleos (elfinanciero.com.mx); de hecho, Jalisco es el principal productor con el 55 por ciento de la producción nacional de huevo (una.org.mx).

Los datos anteriores demuestran que la producción avícola se lleva a cabo con un alto grado de eficiencia, lo cual ha sido posible gracias a las características biológicas de las aves, su elevada capacidad de adaptación a diversos ambientes y alta velocidad reproductiva; además de un rápido crecimiento. Adicionalmente, se ha ejercido una mejora genética constante en las gallinas productoras de huevo, que se complementa con alimentos balanceados que cubren sus requerimientos nutricionales y mejoras en el manejo, sanidad y diseño de instalaciones (Torre, 2008). Sin embargo, para alcanzar las metas de producción, el organismo de las aves se ha forzado constantemente, lo que les produce estrés y las predispone a adquirir nuevas enfermedades (Estudillo, 1996.), cuyo resultado puede variar entre un efecto subclínico que se reflejará en una disminución de la producción, hasta una mortalidad severa que ocasione graves pérdidas económicas.

Uno de los problemas que se puede observar en etapas tempranas del desarrollo de las pollitas de reemplazo es la Infección de Saco Vitelino (ISV), que se

caracteriza por su presentación en el periodo previo a la eclosión. La contaminación bacteriana del pollito puede deberse a que las reproductoras con septicemia le transmitan microorganismos por vía transovárica, o por incubar huevo sucio de piso, recolecciones poco frecuentes, desinfección inadecuada, o bien, deficiente calidad del cascarón, lo que favorece la contaminación y da lugar a un pollito con ISV (Castañeda *et al.*, 2005).

Esta infección es responsable de una mortalidad aproximada del 0.5% durante la primer semana, aunque los pollitos no siempre mueren en los primeros días de vida, el periodo de mayor mortalidad se presenta entre los días 1 a 7 con un incremento entre los días 3 y 5. Algunas de las manifestaciones que se pueden observar en ISV son el cambio de coloración y consistencia del vitelo hasta la presencia de exudado caseoso (Quintana *et al.*, 2005); por su parte, los animales que sobreviven llegan a presentar retraso en el crecimiento. Uno de los principales agentes etiológicos involucrados en la ISV es *Escherichia coli* (*E. coli*); al respecto Rosario *et al.*, (2004a) realizaron un estudio en el que encontraron la presencia de la bacteria en el 45.5 % de los pollitos con ISV muertos durante la primer semana. Desafortunadamente, a pesar de que las pollitas de reemplazo son afectadas severamente, los reportes científicos en México son escasos (Rosario *et al.*, 2004a, Rosario *et al.*, 2004b, Rosario *et al.*, 2005, Cruz *et al.*, 2012; <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/estandarizacion-tecnica-elisa-evaluacion-t4540/165-p0.htm>).

Por otro lado, la peritonitis es una patología que se puede presentar en las aves de postura durante la etapa productiva como consecuencia de los cambios metabólicos y de manejo, lo que puede ocasionar que *E. coli* se distribuya y aumente su población en la cavidad célomica. Se ha reportado que esta enfermedad pueda ser consecuencia de infecciones de tracto respiratorio (Salehi *et al.*, 2010), digestivo o reproductivo (Barnes *et al.*, 2003); sin embargo, en este trabajo se plantea la posibilidad de que sea consecuencia de la infección de saco

vitelino (ISV), esto pudiera deberse a que al infectarse el embrión, *E. coli* permanezca en el remanente del saco vitelino (divertículo de Meckel) y al iniciarse la etapa de postura *E.coli* inicie su replicación y vuelva a causar signología en las gallinas.

*E. coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un microorganismo móvil, no produce esporas, fermenta la glucosa y la lactosa, es catalasa positivo, oxidasa negativo y reduce nitratos a nitritos (Nataro *et al.*, 1998, Rosario *et al.*, 2004b, Ramírez *et al.*, 2009). La prueba de indol es positiva en el 99% de las cepas de *E. coli*, por lo que se considera un procedimiento simple para su diferenciación de otros miembros de la familia.

A pesar de que en humanos *E. coli* es importante para el funcionamiento correcto del proceso digestivo ya que produce vitaminas B y K, existen cepas causantes de diarrea que se han agrupado en seis diferentes tipos patógenos, cada uno definido por sus propiedades de virulencia. De tal forma se conocen: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC). Recientemente, se ha propuesto un grupo más llamado CDEC (citoletal distending *E. coli*) que desprende células en cultivo; aunque su significancia epidemiológica permanece incierta (Fialho *et al.*, 2013; Eslava *et al.*, 2014).

Por otro lado, *E. coli* también puede causar infecciones extraintestinales (ExPEC) ya que ciertas cepas tiene la capacidad de sobrevivir fuera del intestino (Nathan *et al.*, 2014). Este grupo se compone de patotipos como APEC (*Escherichia coli* patógena aviar), NMEC (meningitis en los recién nacidos) y UPEC (*Escherichia coli* uropatógena) (Wiles *et al.*, 2008).

En 1933, Adam mostró que algunas variedades antigénicas de *E. coli* estaban involucradas en brotes de diarrea en niños albergados en cuneros ([http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/ourprofs/ecoli\\_divergente.htm](http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/ourprofs/ecoli_divergente.htm)); pero fue hasta 1944, cuando Kauffman propone un esquema para la clasificación de *E. coli* que causaba diarrea, utilizando sueros de conejos inmunizados con las variedades de los antígenos O (somático), H (flagelar) y K (capsular) (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>). Esta clasificación muestra la diversidad antigénica de *E. coli* pues cepas distantes pueden tener el mismo serotipo y cepas de ambientes cercanos presentar estructura antigénica diferente (Chaudhuri *et al.*, 2012). El LPS consiste de un lípido A que es altamente conservado, una parte central o core y el antígeno O compuesto por subunidades repetidas de azúcares que son responsables de las diferencias antigénicas. Se reconocen más de 187 variedades del antígeno somático además de 56 variedades del antígeno flagelar y 60 capsulares. La combinación específica de los antígenos O y H define el serotipo de una bacteria, mientras que la identificación sólo del antígeno somático se denomina serogrupo. Antes de la introducción de los métodos moleculares, el empleo de la tipificación serológica se utilizaba como marcador que permitía definir la distribución de las clonas virulentas específicas (Nataro *et al.*, 1998).

Ahora bien, la biología molecular aborda varios métodos de tipificación genotípicos. Uno de estos métodos es la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) desarrollada en 1983 por K. B. Mullis, esta técnica ha permitido realizar la clonación del DNA, aunque en el caso de cepas APEC, aún no están claros los genes presentes en una cepa para considerarla dentro del grupo APEC, ya que son bacterias intracelulares muy heterogéneas que poseen una gran cantidad de factores de virulencia como *irp2*, *iucD*, *ireA*, *eitA*, *iutA*, *iron*; *vat*, *hlyF*; *cvaB*; *fimH*, *csgA*, *papC*, *iha*; *ibeA*; *traT*, *ompT*, entre otros (Ewers *et al.*, 2009).

Los genes *iss* y *tsh* se localizan en el plásmido pColicinV. La hemoaglutinina sensible a temperatura es codificada por *tsh*. Ésta fue observada por primera vez en la cepa x7122 de *E. coli* aisladas de aves (Provence *et al.*, 1994; Dozois *et al.*, 2000). Tsh se incluye dentro del grupo de las SPATEs (Serina Proteasas Autotransportadas de la familia Enterobacteriaceae) y su secuencia de aminoácidos es homóloga 50% a la IgA1 proteasa, un tipo de serina proteasa producida por *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*, Tsh tiene estrecha homología con Pic (Protein involved in colonization) integrante también de las SPATEs y secretada por cepas UPEC, EAEC y *Shigella* spp.; estas proteasas se diferencian solamente por dos residuos de aminoácidos (Henderson *et al.*, 1999). Al respecto, se ha reportado que estas proteínas rompen la mucina presente en las glicoproteínas de glóbulos rojos, plaquetas, linfocitos o células dendríticas (CD43, CD93, etc.), también tienen efecto sobre el factor V de la coagulación al evitar la deposición de fibrina para la cicatrización (Kostakioti *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha observado que Tsh contribuye a la adherencia de la bacteria al tracto respiratorio (Dobrindt *et al.*, 2010). Por su parte, Iss es una proteína con un peso de 34 kD (Lynne *et al.*, 2006), fue identificada en *E.coli* a partir de un paciente con septicemia. El gene *iss* también se ha identificado en cepas APEC y fue asociado con la resistencia al complemento (Nolan *et al.*, 2003).

Los metales como hierro, zinc, cobre y manganeso están involucrados en muchos procesos biológicos necesarios para la supervivencia de todos los organismos como constituyentes de enzimas (30-45% son metaloproteínas) o factores de transcripción; sin embargo, en altas concentraciones pueden ser tóxicos (Porcheron *et al.*, 2013). Durante los procesos infecciosos, un mecanismo de protección del hospedero consiste en eliminar el hierro libre, este evento se realiza a través de la transferrina y la lactoferrina. Ante la carencia de fierro, las bacterias compiten por este elemento por medio de pequeñas moléculas llamados sideróforos. De éstos se conocen varios como: enterobactina, salmoquelina,

yersiniobactina y aerobactina, que se sintetizan en el citoplasma de la bacteria y posteriormente son excretadas. En el proceso se realiza la síntesis del receptor que se encarga de la internalización y liberación del hierro en el citoplasma de la bacteria (Garénaux *et al.*, 2011). En el caso específico de las cepas APEC se ha descrito que la salmoquelina y la aerobactina participan en la captación de hierro durante las infecciones sistémicas (Dozois *et al.*, 2003).

En la expresión de la yersiniobactina (Ybt) participa *irp2* ubicado en una isla de patogenicidad (HIP), la cual se ha relacionado con la virulencia de *Yersinia pestis*, *Y. enterocolítica* y *Yersinia pseudotuberculosis*, así como en APEC O1 (Nelwike *et al.*, 2012). Este sideróforo fue identificado por primera vez en *Yersinia enterocolítica*, se ha relacionado con un sistema mixto NRPS/PKS. PKS es un complejo enzimático codificado por *irp1* cuya función es abrir las cadenas de elongación del grupo ceto. Un segundo sistema (NRPS) constituido por un péptido no ribosomal independiente de RNAm (péptido producido como metabolito secundario por bacterias y hongos) (Miller *et al.*, 2010, Garénaux *et al.*, 2011) que está codificado por *irp2* y se compone de anillos de cisteína con enlaces azufre-azufre, este enlace disulfuro confiere el plegamiento y función de la proteína, la cual usa el transportador ABC (Porcheron *et al.*, 2013). Los anillos de cisteína permiten la oxidación del Fe<sub>2</sub> a Fe<sub>3</sub> cuya pérdida de un electrón induce la presentación de radicales hidroxilo y superóxido que dañan ácidos nucleicos, proteínas y membranas.

El sideróforo aerobactina de *Aerobacter aerogenes* (*iucD*), presente en infecciones urinarias (Ling *et al.*, 2013), *iucD* puede estar ubicado en el cromosoma o en plásmidos (Oh *et al.*, 2012); es sintetizado por enzimas codificadas en el clúster *iucABCD* a partir de L-lisina; *iucD* es una monooxigenasa (enzima que incorpora el grupo hidroxilo) formando N6-hidroxi-L-lisina en conjunto con *iucB*

(acetiltransferasa) que forma N6-acetil-N6-hidroxi-lisina, de esta forma lucA y lucC acilan y condensan a N6-acetil-N6-hidroxi-lisina formando la aerobactina ubicada en el plásmido pVM01 (Garénaux *et al.*, 2011). Este sistema está implicado con la propiedad de invasividad de EIEC y *Shigella* por lo que podrían ser importantes en el daño a tejidos profundos y la infección persistente (Ling *et al.*, 2013).

La toxina que induce distención celular letal (*cdt*) es una toxina heterotrimérica tipo AB producida por diferentes bacterias Gram-negativas, los genes que codifican para Cdt se han encontrado en la clase gamma y épsilon de proteobacterias (Jinadasa *et al.*, 2011). Esta toxina secuestra el sistema de control genómico de células eucariotas por lo que Ohara *et al.*, (2004) sugieren que se relaciona con enfermedades crónicas. La proteína está compuesta por las subunidades *cdtABC*, de éstas, *cdtB* es el componente activo pues actúa como nucleasa o fosfatasa, CdtA y CdtC son encargadas de exportar a CdtB al espacio extracelular para su posterior internalización a la célula huésped. El daño al DNA afecta la fase G2, esta es la etapa donde la célula duplica su DNA, finalizando la etapa de mitosis. Jinadasa *et al.*, (2011) sugieren que los residuos para la actividad de CdtB son altamente conservados, aunque la secuencia de sus aminoácidos varíe entre las bacterias, lo que indica su especificidad de célula.

Como ya se mencionó, *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) pertenecen al grupo de patotipos diarreogénicos. Uno de los genes que posee este grupo es *ipaH* (Thiem *et al.*, 2004, Lobersli *et al.*, 2012). Este gen produce una proteína que puede ser esencial para la virulencia pues está expuesta en la superficie de la bacteria, sin embargo, no tiene un péptido señal por lo que probablemente para su salida exista un mecanismo alternativo de transporte o factores adicionales para su posicionamiento en la superficie celular (Hartman *et al.*, 1990). A pesar de que este gen se ha reportado tradicionalmente en cepas EIEC y *Shigella*, en un

estudio realizado por Rosario *et al.*, (2005) se identificó *ipaH* en cepas APEC aisladas de ISV.

Para realizar la caracterización de las bacterias patógenas han sido empleados diferentes procedimientos con el propósito de establecer su virulencia. De manera semejante, los enfoques filogenéticos han ayudado a su clasificación (Bonacorsi *et al.*, 2000), por lo que la filogenia se define como la relación evolutiva entre los diferentes grupos de organismos (Abdul-Razzaq *et al.*, 2011), gracias a lo cual las diferencias entre *E. coli* patógenas y comensales son correlacionadas con sus antecedentes filogenéticos (Moreno *et al.*, 2006).

Algunos procedimientos como las enzimas multilocus, RAP PCR, ERIC, PFGE, etc. (Clermont *et al.*, 2000) se han implementado para conocer la identidad clonal de las bacterias. Otra estrategia que se ha utilizado para tipificar es el identificado por Clermont *et al.*, (2000) en el que diseñaron una técnica de PCR multiplex que utiliza los marcadores *chuA*, gen involucrado en el transporte del grupo hemo que proviene de la cepa EHEC O157:H7; *yjaA*, gen obtenido de una cepa K-12 y utilizado como marcador para identificar las cepas de *E. coli* comensales (Abdul-Razzaq *et al.*, 2011) y finalmente el fragmento de DNA TspE4.C2 (esterasa lipasa) (Gordon *et al.*, 2008). Con este procedimiento *E. coli* se ha agrupado en las categorías A, B1, B2 y D (Moreno *et al.*, 2006), las dos primeras incluyen principalmente las cepas comensales que frecuentemente carecen de genes de virulencia, aunque algunas de ellas se han aislado a partir de cuadros clínicos; mientras que las cepas patógenas extraintestinales derivan principalmente del grupo filogenético B2 y en un grado menor al grupo D (Jhonson *et al.*, 2000. Escobar-Páramo *et al.*, 2000 4b) mencionan que las cepas pertenecientes al filogrupo B2 pueden ser más resistentes a agentes antibacterianos.

Dado que las infecciones de aves causadas por *E. coli*, representan un problema importante tanto para la sociedad (por el impacto económico), como para la salud pública (por la aparición de brotes), se han realizado estudios que refieren la participación de *E. coli* en la etiología de la infección de saco vitelino y peritonitis, pero no hay información relacionada con la participación de clonas particulares asociadas con ambos eventos clínicos. Los procedimientos tradicionales de caracterización de bacterias (metabolismo, estructura antigénica, fagotipificación, etc.), aunque útiles, no permiten de manera contundente establecer la asociación entre ambos eventos clínicos. En los últimos años, el desarrollo de la biología molecular ha permitido el desarrollo de procedimientos accesibles y confiables para definir la identidad clonal de bacterias y otros microorganismos.

## JUSTIFICACIÓN

La colibacilosis es un cuadro clínico que afecta en forma importante a la industria avícola cuya consecuencia son grandes pérdidas económicas. Por lo tanto es importante definir si los aislados de *E. coli* obtenidos de muestras a partir de pollitas con infección de saco vitelino alojadas en una granja para la etapa de crecimiento presentan características similares (serotipos, genes de virulencia e identidad filogenética) a los aislados obtenidos de la misma parvada durante la etapa de postura que desarrollaron cuadros de peritonitis.

## HIPÓTESIS

Las cepas de *E. coli* involucradas en infección de saco vitelino y peritonitis, presentan los mismos genes de virulencia y pertenecen a los mismos grupos filogenéticos, por lo que presentan similitudes ambos cuadros clínicos.

## OBJETIVO GENERAL

Conocer si existen similitudes entre las cepas de *Escherichia coli* aisladas de aves con infección de saco vitelino y de aves con peritonitis, con base a la presencia de genes de virulencia y al grupo filogenético.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la presencia de genes de virulencia descritos para cepas APEC (*iucD*, *cdtB*, *irp2*, *tsh*, *ipaH* e *iss*), en aislados de *E. coli* obtenidos de aves con infección de saco vitelino y peritonitis.
- Identificar los grupos filogenéticos a los que pertenecen las cepas de *E. coli* aisladas de los dos cuadros clínicos.
- Correlacionar entre la presencia de genes de virulencia, grupo filogenético y el cuadro clínico asociado con las cepas APEC en estudio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CEPAS BACTERIANAS

Las cepas que se analizaron en el presente estudio pertenecen a un trabajo previo, el cual se llevó a cabo en el estado de Jalisco donde se realizó la toma de muestras a partir de 200 pollitas de reemplazo muertas por ISV de entre el 1° a 10 días de nacidas (Granja A), de las cuales se aislaron 170 cepas de *E. coli* que pertenecía a 26 diferentes serogrupos. Una vez que ese mismo lote de aves llegó a la edad adulta fue distribuido en tres granjas de producción (B, C y D), en las cuales se tomaron muestras a partir de gallinas muertas por peritonitis entre las 24 a las 28 semanas de edad; a partir de ellas se identificaron 170 cepas de *E. coli* pertenecientes a 25 serogrupos (Cruz *et al.*, 2012).

Para la selección de las cepas que se incluirían en el presente trabajo se eligieron todas aquellas pertenecientes a los grupos más frecuentes en cada una de las etapas (crianza y producción); las cuales fueron en el caso de aves con ISV O82 (n=34) y O25 (n=20), mientras que a partir de las aves con Peritonitis fueron O2 (n=26) y O25 (n=45). En total se trabajó con 125 aislados, 54 de pollitas de reemplazo (1 a 10 días) con infección de saco vitelino y 71 provenientes de gallinas con peritonitis (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Cepas de *E. coli* aisladas a partir de pollitas de remplazo con infección del saco vitelino y gallinas con peritonitis pertenecientes al trabajo de Cruz *et al.*, 2012**

	N° de cepas	Serogrupo
54 cepas (ISV)	20	O25
	34	O82
71 cepas (peritonitis)	45	O25
	26	O2
Total de aislados	125	

Adicionalmente, para los ensayos de PCR se utilizaron como testigos positivos las cepas CR-00997 (*iucD*, *irp2*, *cdtB*, *iss* y *tsh*), y la cepa EIEC 95079 (*ipaH*). La identidad de los controles se ratificó utilizando el sistema Api20E.

### **IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli***

A partir de cultivos conservados en gelosa especial se tomó una muestra de la parte confluyente, ésta se inoculó en agar McConkey para realizar la selección de las colonias lactosa positivas. Para confirmar su identidad se realizaron pruebas bioquímicas (TSI, SIM, Urea, LIA, Citrato y MIO) y una vez identificados los cultivo se pasaron a tubos de gelosa especial que se mantuvieron a temperatura ambiente.

La extracción de DNA se realizó por choque térmico, extracción con uso de proteinasa K (Tiwari *et al.*, 2009) (Sigma-Aldrich), por kit DNasy blood y Tissue (Li *et al.*, 2014) (Quiagen) y extracción de DNA por hervido (Lobersli *et al.*, 2012). El procedimiento seleccionado para el trabajo fue este último (hervido); para el cual se utilizó medio Luria Bertani (LB) para sembrar las colonias (5 gr de Bacto triptona, 2,5 gr de extracto de levadura, 5 gr de NaCl y 7.5 gr de agar bacteriológico en 500 ml de agua destilada). Para la extracción de DNA se tomaron 5 colonias y se mezclaron en 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O milli Q durante 20 segundos, la concentración de bacterias se ajustó a  $3 \times 10^8$  UFC/ml equivalente al tubo número 1 de McFarland, la suspensión bacteriana se hirvió por 10 minutos para posteriormente centrifugar a 35,000 g/2 min (Centrifuge 5415C, Eppendorf). El templado obtenido se utilizó de inmediato para la realización de la PCR.

### **SELECCIÓN Y DISEÑO DE GENES DE VIRULENCIA**

Se utilizaron las diferentes secuencias reportadas para los genes de virulencia *iucD*, *irp2*, *cdtB*, *ipaH* e *iss* para cepas APEC (Ramírez *et al.*, 2009) y para el caso

de *tsh* se diseñó el iniciador (Cuadro 2). Previamente, para identificar la ubicación de las secuencias de los diferentes genes se realizó su búsqueda en la base de datos del GenBank, posteriormente se realizó análisis *in silico* con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), para finalmente estandarizar las condiciones para la PCR.

Los cálculos se hicieron con la fórmula  $C_1 \times V_1 / C_2 \times V_2$ . El cálculo de  $T_m$  se realizó con el programa DNAMAN Versión 3.0 y de forma manual de acuerdo a la siguiente fórmula:  $F = (T + A) \times 2 + (G + C) \times 3$ ,  $R = (T + A) \times 2 + (G + C) \times 3$ ,  $\bar{X} = (\Sigma_1 + \Sigma_2) / 2$  Donde: F- forward, R- reverse, T- timina, A- adenina, G- guanina, C- citosina, 2 y 3 son los puentes de hidrógeno.

**Cuadro 2. Secuencias utilizadas para la amplificación de diferentes genes relacionados con la virulencia de *Escherichia coli* patógena aviar (APEC).**

Gen	Secuencia	N° acceso al GenBank	Temperatura de alineamiento	Producto Esperado	Referencia
<i>iss</i>	F:gtggcgaaaactagtaaacagc R: cgcctcgggggtgataa	X52665.1	50°C	758 pb	Tesis Ramírez 2009*
<i>cdtB</i>	F:gaaaataaatggaacacacatgtccg R: aaatctcctgcaatcatccagta	NC_008563.1	50°C	467 pb	Tesis Ramírez 2009*
<i>irp2</i>	F: aaggattcgtgtaccggac R: aactcctgatacaggtggc	NC_008563.1	56°C	414 pb	Tesis Ramírez 2009*
<i>iucD</i>	F: acaaaaagtctatcgcttc R: cctgatccagatgatgctc	NC_007675.1	56°C	711 pb	Tesis Ramírez 2009*
<i>tsh</i>	F: ataagcagggagaatttgc R: tgcctgtactgtcctaat	AF218073.1	53°C	364 pb	En este estudio
<i>ipaH</i>	F: gttccttgaccgctttccgataccgctc R: gccggtcagccaccctctgagagtac	M76445.1	56°C	620 pb	Tesis Ramírez 2009*

\*Con modificaciones en la secuencia.

## **DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA**

La detección de genes de virulencia se realizó por un ensayo de PCR punto final. La mezcla de PCR consistió de 25ul totales ajustando el volumen con agua milli Q estéril, 2.5 ul de buffer 1x (10x), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.2 mM de dNTPs (10 mM), 0.06 U/ul de Taq polimerasa (5 U/ul) (Invitrogen), 0.4 pM de cada iniciador (10 pM) (Sigma-Aldrich) y 2 ul de templado DNA. La PCR se realizó con un sistema de Swift MaxPro™, Modelo SWT-MXP+SWT-MXP-BLC-\*, utilizando las siguientes condiciones: 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 56°C (*iucD*, *ipaH*, *irp2*), 53°C (*tsh*), 50°C (*iss*, *cdtB*); 30 segundos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa a una concentración de 1.2 % en TBE (Tris-Borato-EDTA al 0.5%), se adicionó 1 ul de buffer de carga (Cyan/Orange Loading buffer, Invitrogen) más 6 ul de producto de PCR. Se mezcló y se colocó en los pozos del gel, como marcador de peso molecular se utilizó DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen) y la electroforesis se realizó a 165 volts durante 60 minutos; finalmente, los amplificados se visualizaron al teñir con bromuro de etidio (Bio-Rad) 0,5 ug / ml durante 20 minutos. Después de la electroforesis, el gel se observó en un transiluminador de rayos UV y se tomó la imagen con una cámara digital Canon IXUS 9015. Se consideró como un resultado positivo la aparición de una banda de un tamaño igual al descrito para cada uno de los iniciadores.

## **DETECCIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS**

Se desarrolló una PCR multiplex para la búsqueda de grupos filogenéticos, para lo cual se utilizó una mezcla de los iniciadores *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 de acuerdo a lo reportado por Clermont *et al.*, (2000).

La mezcla de PCR consistió de 25ul totales ajustando el volumen con agua milli Q estéril, 2.5 ul de buffer 1x (10x) 1.5 mM de  $MgCl_2$  (50 mM), 0.2 mM de dNTPs (10 mM), 0.05 U/ul de Taq polimerasa (5 U/ul) (Invitrogen), 1.2 pM de cada cebador (30pM) (Sigma-Aldrich) y 6 ul de templado DNA. Para la PCR se utilizó un sistema Swift MaxPro™, Modelo SWT-MXP+SWT-MXP-BLC-\*, con las siguientes condiciones: 4 minutos a 94°C; 30 ciclos de 5 segundos a 94°C; 10 segundos a 59°C; 30 segundos a 72°C y finalmente 5 minutos a 72 °C.

Los productos de la PCR fueron visualizados en gel de agarosa a una concentración de 1.2 % en TBE (Tris-Borato-EDTA al 0.5%), se adicionó 1 ul de buffer de carga (Cyan/Orange Loading buffer, Invitrogen) más 6 ul de producto de PCR, se mezcló y se colocó en los pozos del gel, como marcador de peso molecular se empleó DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen), se corrió el gel a 165 volts durante 60 minutos y se tiñeron con bromuro de etidio (Bio-Rad) 0,5 ug / ml durante 20 minutos. Después de la electroforesis, el gel se observó en un transiluminador de rayos UV y se tomó la imagen con una cámara digital Canon IXUS 9015. Se consideró como un resultado positivo la aparición de una banda de un tamaño igual al descrito para cada uno de los iniciadores (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Iniciadores utilizados para amplificar las secuencias de los grupos filogenéticos a través del ensayo de PCR en cepas de *E. coli* aisladas a partir de aves con infección de saco vitelino y peritonitis**

Segmento	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Producto esperado
<i>chuA</i>	F: gacgaaccaacgggcaggat R: tgccgccagtaccaaagaca	59°C	279 pb
<i>yjaA</i>	F: tgaagtgtcaggagacgctg R: atggagaatgcgttcctcaac	59°C	211 pb
TspE4.C2	F: gagtaatgtcggggcattca R: cgcgccaacaaagtattacg	59°C	152 pb

Clermont *et al.*, 2000.

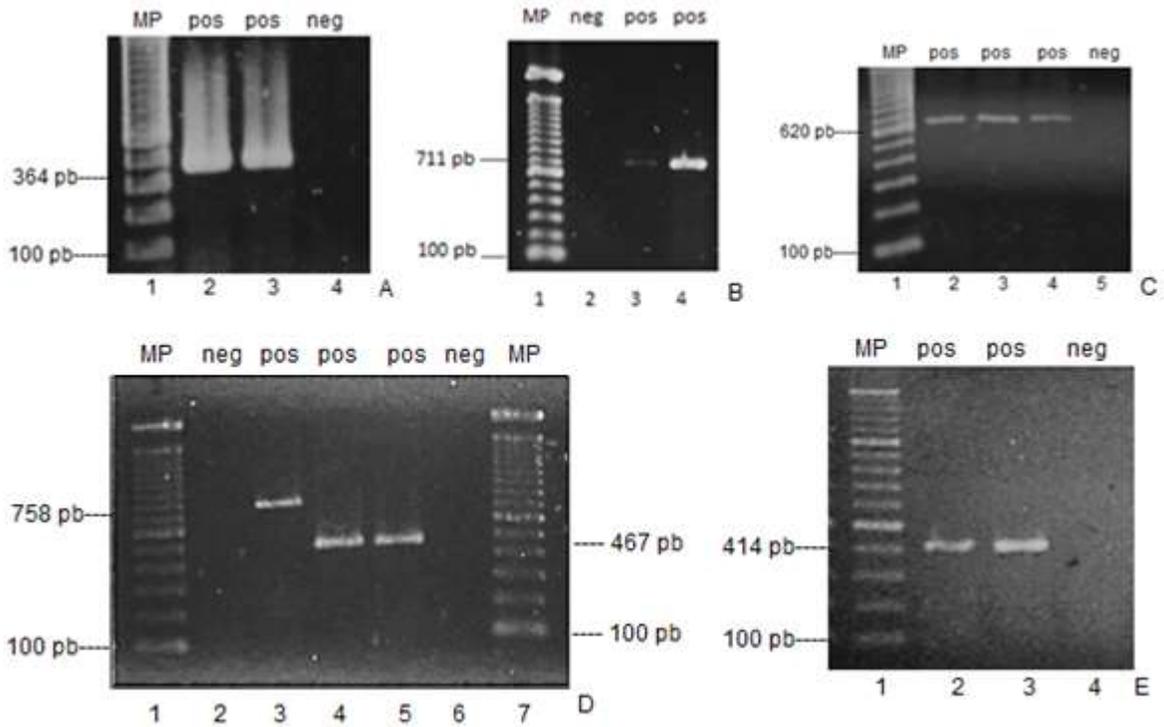
## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un estudio tipo observacional, transversal por cohortes cuya prevalencia observada en los resultados obtenidos de los factores de virulencia a partir de ISV y peritonitis se analizaron con el programa JMP ® 10.0.0 SAS Institute Inc. 2012, además se utilizó una prueba de Ji-cuadrada para observar si las variables genes de virulencia, grupos filogenéticos, cuadros clínicos y serogrupos eran independientes, los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados significativos.

## RESULTADOS

### DETECCIÓN DE GENES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA

Mediante el método de PCR se determinó la presencia de 6 genes (*iucD*, *irp2*, *tsh*, *ipaH*, *iss*, *cdtB*) asociados a virulencia en 54 cepas APEC aisladas de pollitas con infección de saco vitelino y 71 cepas aisladas a partir de gallinas con peritonitis (Figura 1).



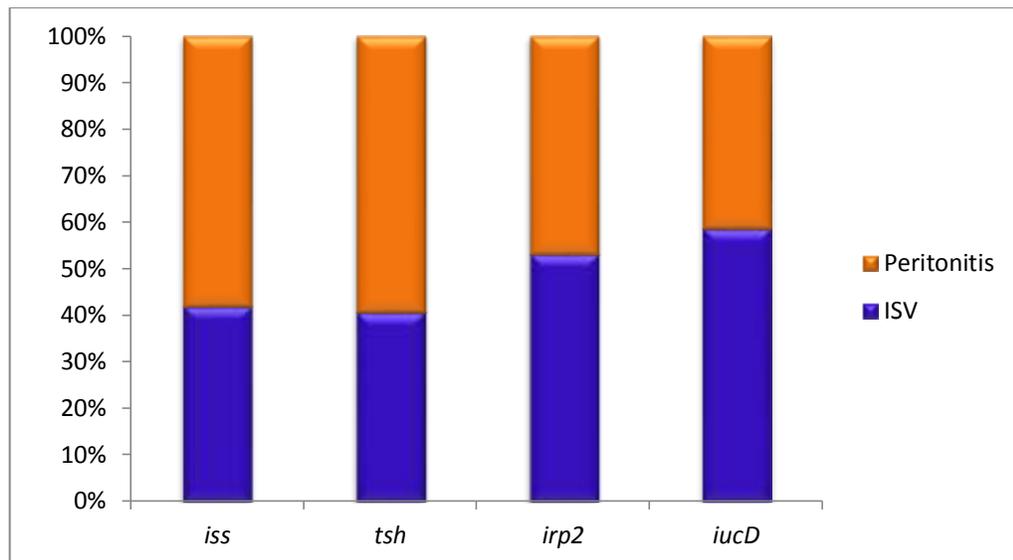
**Figura 1. Amplificado para las secuencias de los genes de virulencia.** A) *tsh*: carril 1 marcador de peso molecular (MP) 100 pb, carril 2 y 3 control positivo de 364 pb, carril 4 control negativo. B) *iucD*: carril 1 marcador de peso molecular (MP) 100 pb, carril 2 control negativo, carril 3 y 4 control positivo 711 pb. C) *ipaH*: carril 1 marcador de peso molecular (MP) 100 pb, carril 2, 3 y 4 control positivo 620 pb, carril 5 control negativo. D) *iss* y *cdtB*: carril 1 marcador de peso molecular (MP) 100 pb, carril 2 control negativo *iss*, carril 3 control positivo *iss* 758 pb, carril 4 y 5 control positivo *cdtB* 467 pb, carril 6 control negativo *cdtB*, carril 7 marcador de peso molecular (MP) 100 pb. E) *irp2*: carril 1 marcador de peso molecular (MP) 100 pb, carril 2 y 3 control positivo 414 pb, carril 4 control negativo.

Los resultados de PCR mostraron que los genes *irp2* (ISV 94 % y peritonitis 63 %), *iucD* (ISV 76 % y peritonitis 41 %), *tsh* (ISV 20 % y peritonitis 23 %) e *iss* (ISV 72 % y peritonitis 76 %) obtenidos a partir de cada patología fueron los genes que se encontraron con mayor frecuencia en las cepas analizadas; por otro lado, el gen *cdtB* solamente se identificó en una cepa aislada de infección de saco vitelino, mientras que en ninguna de las cepas se identificó la presencia de *ipaH* (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Presencia de diferentes genes relacionados con la virulencia de cepas APEC aislados de infección de saco vitelino y peritonitis**

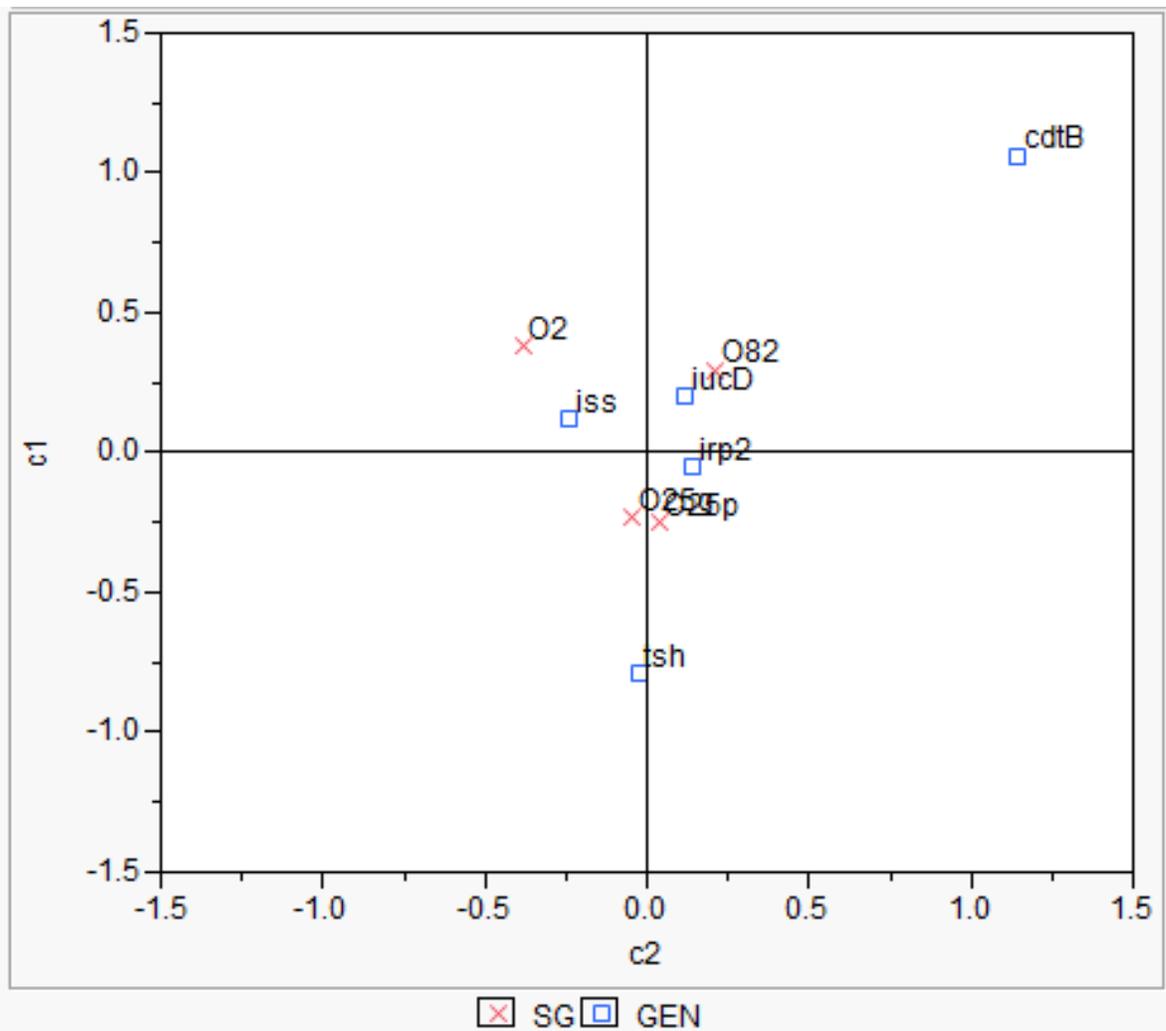
<b>Genes amplificados</b>	<b>Infección de saco vitelino (n = 54) Número (%)</b>	<b>Peritonitis (n = 71) Número (%)</b>
<i>iss</i>	39 (72)	54 (76)
<i>irp2</i>	51 (94)	45 (63)
<i>iucD</i>	41 (76)	29 (41)
<i>tsh</i>	11 (20)	16 (23)
<i>cdtB</i>	1 (2)	
<i>ipaH</i>		

Así mismo, al analizar la prevalencia de los genes en cada cuadro clínico se observó una frecuencia mayor de *irp2* e *iucD* (53 % y 59 %) en ISV, mientras que en peritonitis la mayor frecuencia se presentó en el gen que codifica para incremento de supervivencia al suero (*iss* 58 %) y la adhesina (*tsh* 59%) (Figura 2). Aunque, de acuerdo con el estadístico de prueba no existe relación entre los genes de virulencia y cada patología ya que el grado de asociación es de 0.95 % ( $P = 0.1483$  y  $R^2 = 0.0095$ ).



**Figura 2. Gráfica en la que se muestra la asociación entre los genes de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas de dos cuadros clínicos**

Ahora bien, al realizar el análisis entre serogrupo y los genes de virulencia, se observó que el serogrupo O25 tenía una frecuencia de 35 % de *irp2* en peritonitis y 33 % en ISV, *tsh* representó el 15 % en peritonitis y 17 % en ISV; con respecto al serogrupo O82 fue representado por *iucD* con el 33 %, dentro de este serogrupo se ubicó *cdtB* con 1.20% y el serogrupo O2 fue representado por *iss* con el 54 %. Por lo que el análisis de correspondencia indicó que *irp2* tenía mayor afinidad por el serogrupo O25 presente en ISV y peritonitis, en el caso de *iucD* se observó que fue afín al serogrupo O82 e *iss* al serogrupo O2, sin embargo aunque *tsh* se encuentra a una distancia mayor del centro del eje permanece ubicado dentro de él, lo cual indica su relación con el serogrupo O25 (Figura 3). El estadístico de prueba el cual indicó una relación entre los genes de virulencia y el serogrupo ya que el grado de asociación fue de 5 % ( $P = 0.0012$  y  $R^2 = 0.0500$ ).



**Figura 3. Análisis de correspondencia para la relación entre las variables genes de virulencia y serogrupo** Las distancias observadas en los puntos representados en cada cuadrante del plano están relacionadas con el grado de asociación entre los genes de virulencia y los serogrupos. SG = serogrupo

En cuanto al análisis de las combinaciones obtenidas entre los genes de virulencia con los serogrupos, se observó que el total del serogrupo O25 estuvo representado por *iucD-irp2-iss* (25 % ISV y 22 % peritonitis), seguido por *irp2-iss* (15 % ISV y 18 % peritonitis) y finalmente por *irp2-tsh-iss* (10 % ISV y 13 % peritonitis); la combinación más frecuente en el serogrupo O82 fue *iucD-irp2-iss* con 50 % en ISV y el serogrupo O2 presentó la combinación *iss* como único gen

en 80 % a partir de peritonitis (Cuadro 5). De acuerdo con el estadístico de prueba hubo relación entre la combinación de genes de virulencia y los serogrupos con un grado de asociación de 20 % ( $P = 0.0001$  y  $R^2 = 0.1959$ ). Por otro lado se identificaron 3 cepas que no presentaron ningún gen de los que se buscaron.

**Cuadro 5. Asociación de las 16 combinaciones observadas en los genes de virulencia con los serogrupos O82, O25 de pollitas con ISV y O25, O2 aislados de gallinas con peritonitis**

Combinaciones de los genes de virulencia	Serogrupos				Total (%)
	O82 (Número / %)	O25p (Número/ %)	O25g (Número/ %)	O2 (Número/ %)	
Sin genes				3/2.4	2.4
<i>irp2</i>	4/3.2	1/0.8	6/4.8	1/0.8	9.6
<i>iss</i>			2/1.6	8/6.4	8.0
<i>iucD</i>				1/0.8	0.8
<i>tsh</i>			1/0.8		0.8
<i>iucD, irp2</i>	6/4.8	1/0.8	3/2.4		8.0
<i>iucD, iss</i>	3/2.4			6/4.8	7.2
<i>irp2, iss</i>	2/1.6	3/2.4	8/6.4	4/3.2	13.6
<i>tsh, iss</i>			3/2.4		2.4
<i>iucD, tsh</i>			1/0.8		0.8
<i>iucD, irp2, iss</i>	17/13.6	5/4.0	10/8.0	3/2.4	28.0
<i>iucD, cdtB, irp2</i>	1/0.8				0.8
<i>iucD, irp2, tsh</i>		2/1.6	1/0.8		2.4
<i>irp2, tsh, iss</i>	1/0.8	2/1.6	6/4.8		7.2
<i>iucD, tsh, iss</i>			1/0.8		0.8
<i>iucD, irp2, tsh, iss</i>		6/4.8	3/2.4		7.2
Total	54/100		71/100		100

O25p = serogrupo a partir de pollitas con ISV, O25g = serogrupo a partir de gallinas con peritonitis

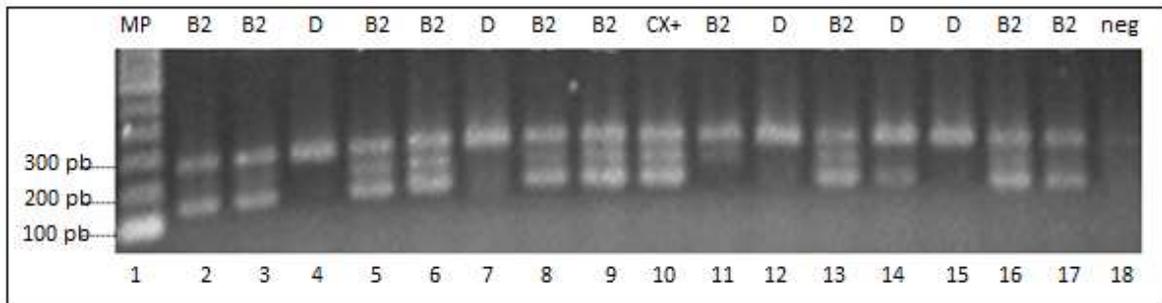
## GRUPOS FILOGENÉTICOS

Al realizar el análisis de los grupos filogenéticos para definir si las cepas de ISV y peritonitis pertenecían a los grupos comensales o virulentos se encontró que solo 4 cepas (3 %) son del grupo de cepas comensales B1 y 121 cepas correspondían a los grupos virulentos extraintestinales D (29 %) y B2 (68 %) (Cuadro 6, Figura 4).

La asociación entre grupo filogenético e infección de saco vitelino y peritonitis se puede observar en la figura 5. Las barras indican que la proporción del grupo filogenético B2 es mayor en ISV (78 %) que en peritonitis (64 %), sin embargo, el grupo filogenético D se presentó en mayor proporción en peritonitis (30 %) que en ISV (22%).

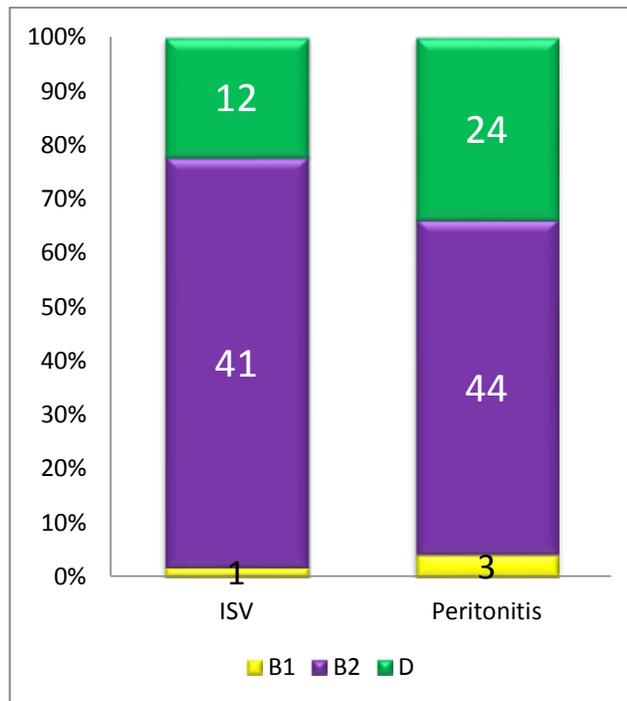
**Cuadro 6. Grupos filogenéticos de cepas APEC aisladas de aves con infección de saco vitelino y peritonitis**

Grupo filogenético	Infeción de saco vitelino	Peritonitis
	Número (%)	Número (%)
A		
B1	1 (2)	3 (4)
D	12 (22)	24 (34)
B2	41 (76)	44 (62)
Total de cepas que pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D	53 (98)	68 (96)

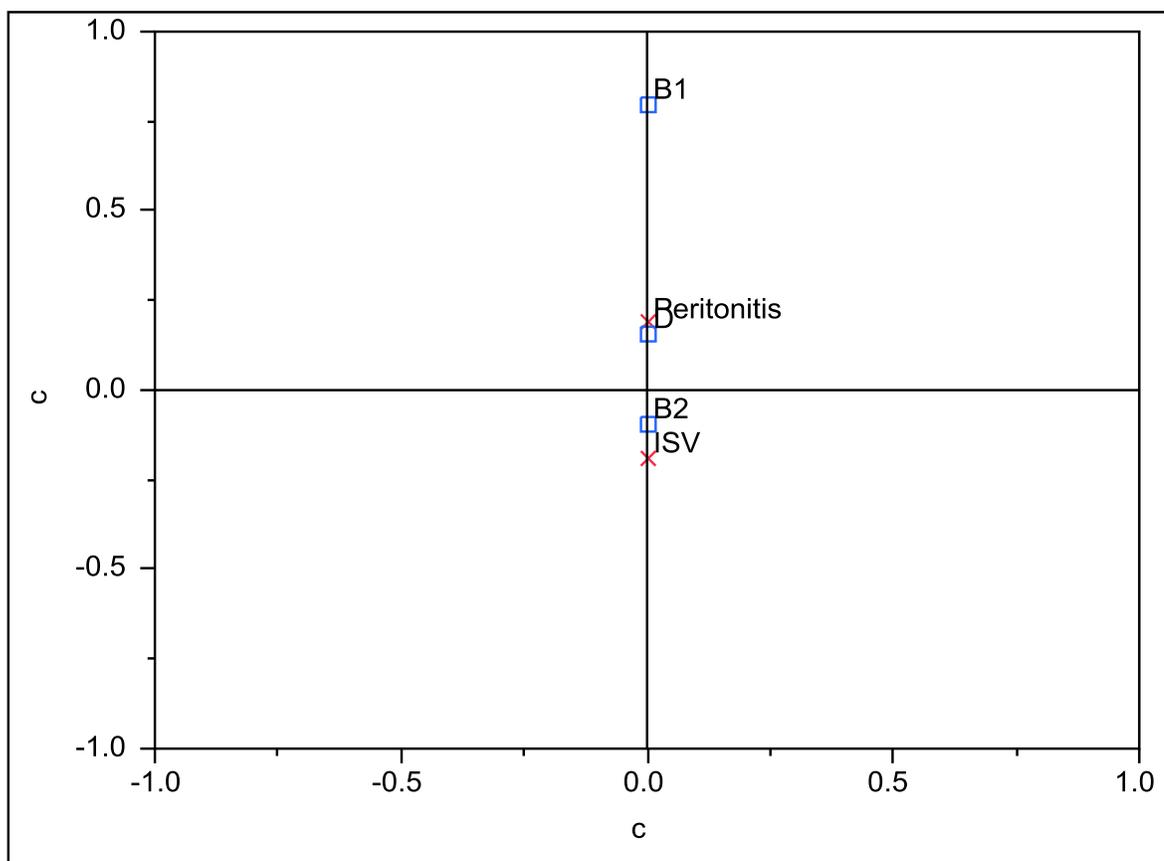


**Figura 4. Amplificado para las secuencias de los grupos filogenéticos.** Carril 1 marcador de peso molecular (MP) 100 pb, carril 2 y 3 grupo filogenético B2 presenta *chuA* 279 pb, *yjaA* 211 pb y fragmento de DNA 152 pb, carril 4 grupo filogenético D presenta *chuA* 279 pb, carril 5 y 6 grupo filogenético B2, carril 7 grupo filogenético D, carril 8 y 9 grupo filogenético B2, carril 10 control positivo, carril 11 grupo filogenético B2, carril 12 grupo filogenético D, carril 13 grupo filogenético B2, carril 14 y 15 grupo filogenético D, carril 16 grupo filogenético B2, carril 17 grupo filogenético B2 y carril 18 control negativo.

Por lo que, el análisis de correspondencia indica que ISV (41 de 54 cepas totales) y peritonitis (44 de 71 cepas totales) tienen afinidad por el filogrupo B2 ya que se encuentran ubicados sobre el mismo eje vertical, sin embargo al analizar el grupo filogenético D, peritonitis tiene mayor número de cepas (24) en este grupo filogenético que ISV (12), por lo que peritonitis se encuentra ubicado más cerca del filogrupo D. Por otro lado, aunque B1 (3 de 71 cepas totales) se encuentre a una distancia mayor del centro del eje permanece en el mismo eje vertical, lo cual indica su relación con peritonitis (Figura 6). De acuerdo con el estadístico de prueba existe asociación entre el grupo filogenético y las patologías con un grado de asociación de 3 % ( $P = 0.0063$  y  $R^2 = 0.0272$ ).



**Figura 5. Frecuencia de cepas positivas en infección de saco vitelino y peritonitis así como en el grupo filogenético.** Los números presentes en cada barra indican el número de cepas positivas encontradas en cada grupo filogenético.

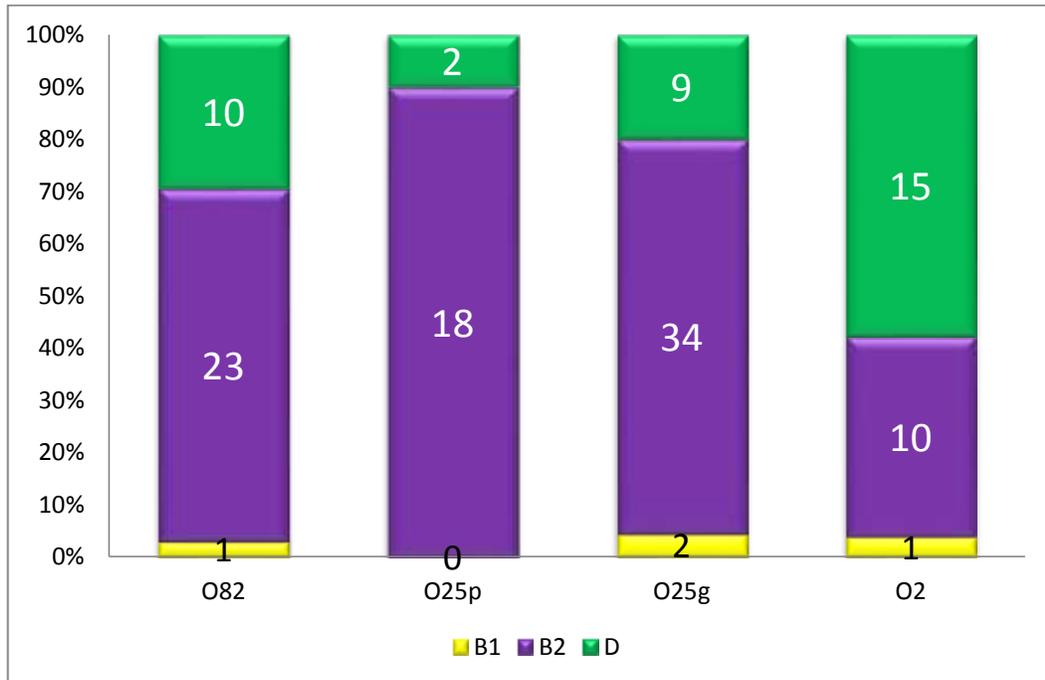


X PATOLOGÍA □ GRUPO FILOGENÉTICO

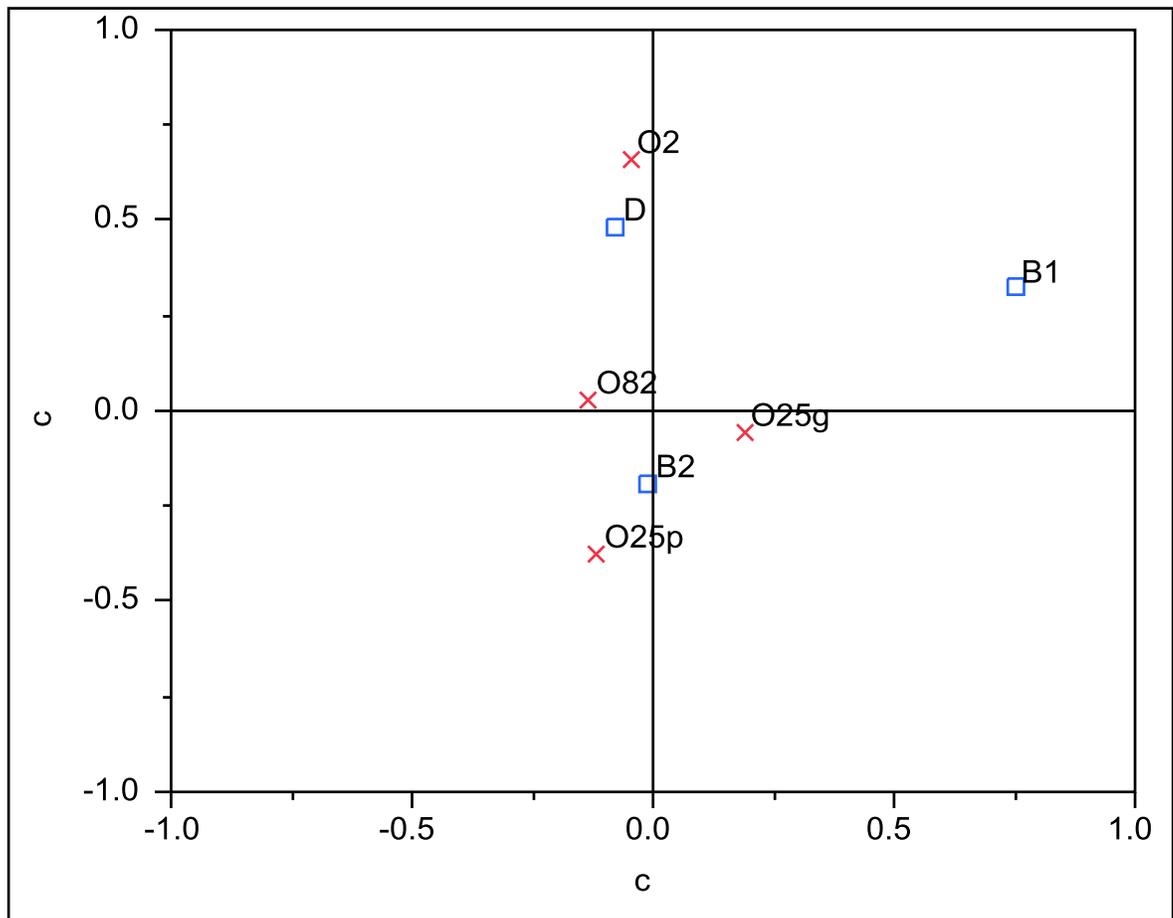
**Figura 6. Análisis de correspondencia para los grupos filogenéticos y cada patología (ISV y peritonitis).** Los puntos ubicados en cada cuadrante indican la relación entre las variables grupo filogenético e ISV y peritonitis de acuerdo con la distancia observada en los puntos representados en el plano.

La relación observada entre grupos filogenéticos y los serogrupos se puede observar en la figura 7, en el que se observa al grupo filogenético B2 con la mayor frecuencia ubicado en el serogrupo O25 (88 % en ISV y 72 % peritonitis). El serogrupo O2 presentó una frecuencia de 54 % y pertenece al grupo filogenético D y el serogrupo O82 presentó una frecuencia de 70 % y se encontró en el grupo filogenético B2. Del mismo modo el análisis de correspondencia indica que el serogrupo O25 de ISV y peritonitis así como O82 tienen mayor afinidad por el filogrupo B2, en cambio, el serogrupo O2 es afín al grupo filogenético D (Figura 8).

De acuerdo con el estadístico de prueba existe relación entre el grupo filogenético y el serogrupo con un grado de asociación de 8 % ( $P = 0.0001$  y  $R^2 = 0.0806$ ).



**Figura 7. Frecuencias observadas a partir del análisis entre grupos filogenéticos y los serogrupos O82, O25 de pollitas con ISV y O25, O2 de gallinas con peritonitis.** Los números indicados en las barras refieren al número de cepas positivas presentes en los cuatro serogrupos de cada grupo filogenético.

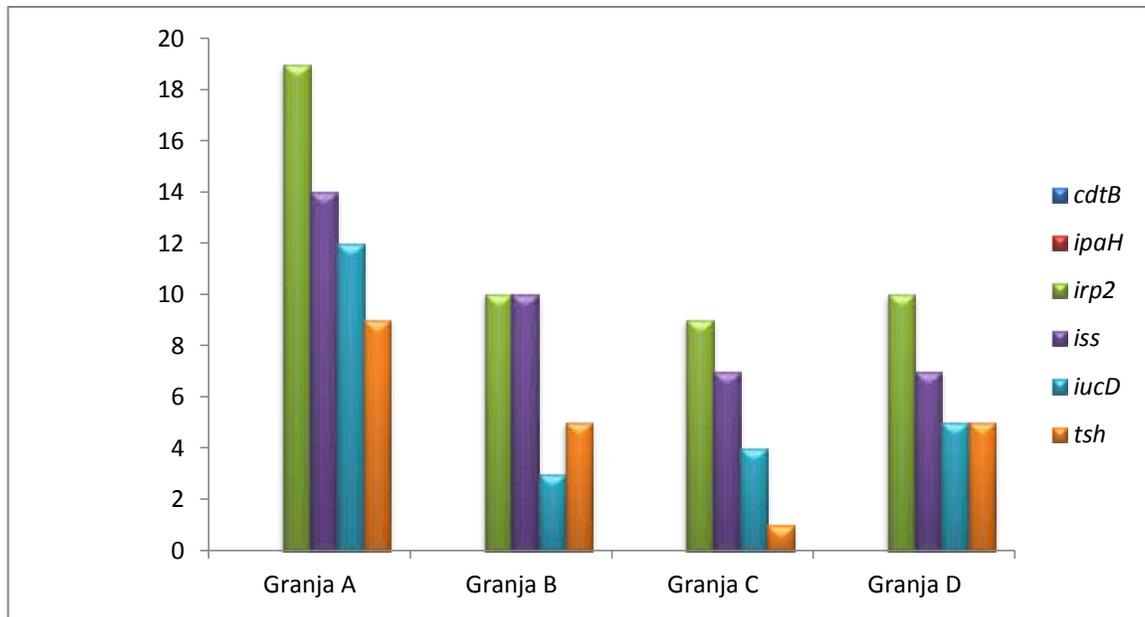


x PATOLOGÍA    □ GRUPO FILOGENÉTICO

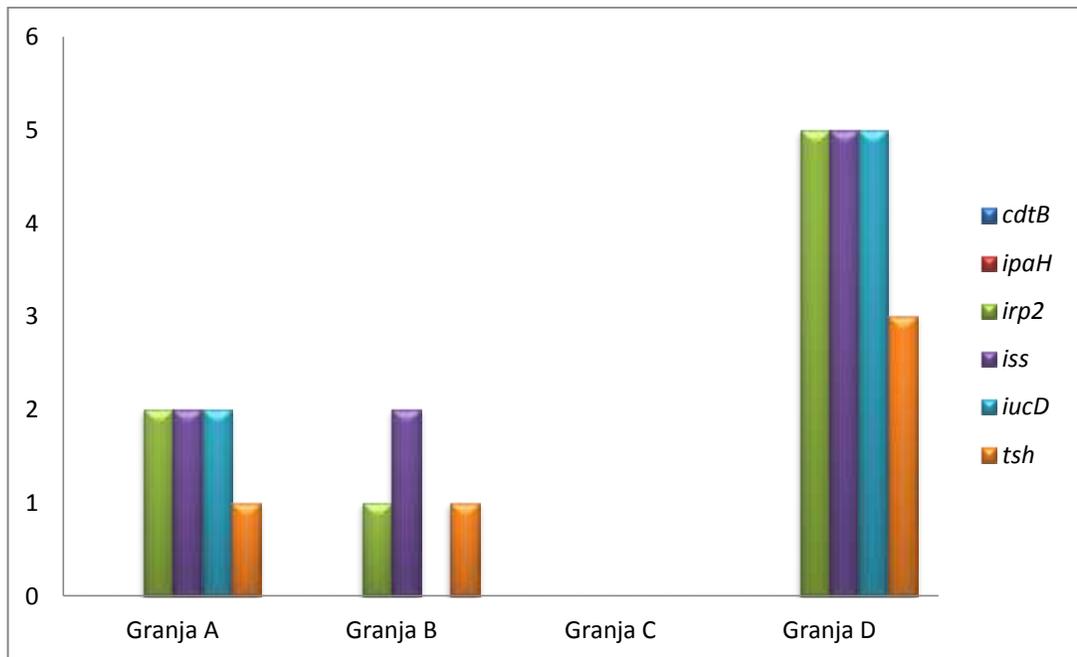
**Figura 8. Análisis de correspondencia para la relación entre grupo filogenético y los serogrupos O82, O25p de ISV y O25g, O2 de peritonitis.** El plano indica la relación entre las variables grupo filogenético y serogrupo de acuerdo con cada distancia entre los puntos de cada cuadrante. O25p = serogrupo presente en pollitas con ISV. O25g = serogrupo presente en gallinas con peritonitis.

Los resultados obtenidos en la asociación de las granjas en las que fueron tomadas las muestras y genes de virulencia pertenecientes al serogrupo O25 así como su ubicación en el grupo filogenético B2, indicó que la granja A (ISV) presentó una curva similar a las curvas observadas en las granjas B, C y D (peritonitis) (Figura 9).

Por otro lado, el mismo serogrupo O25 pero del grupo filogenético D presentó un comportamiento similar aunque fue solo en las granjas A y D, en cambio, las granjas B y C presentaron un comportamiento diferente, es decir, la frecuencia de los genes de virulencia fue heterogéneo (Figura 10).



**Figura 9. Asociación de las variables genes de virulencia, grupo filogenético B2 y serogrupo O25p de ISV y O25g de peritonitis con las granjas de las cuales se obtuvieron las muestras analizadas**



**Figura 10. Asociación de las variables genes de virulencia, grupo filogenético D y serogrupo O25p de ISV y O25g de peritonitis con las granjas de las cuales se obtuvieron las muestras analizadas. O25p = serogrupo presente en pollitas con ISV. O25g = serogrupo presente en gallinas con peritonitis.**

## DISCUSIÓN

Los cuadros clínicos de infección de saco vitelino y peritonitis son dos padecimientos importantes de aves que afectan la industria avícola, principalmente por las grandes pérdidas económicas que ocasionan (Circella *et al.*, 2012). Lo anterior ha generado un gran interés en el estudio de las cepas causantes de ambas patologías (Rosario *et al.*, 2004a; 2004b y 2005; Ewers *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2012). Entre los aspectos relevantes de las cepas APEC está la expresión de factores de virulencia, similares a los identificados en las cepas que causan infecciones extraintestinales (ExPEC) en humanos (Aslam *et al.*, 2014). En el estudio se incluyeron cepas de ISV (54) y peritonitis (71), aisladas de aves de la misma parvada. Las cepas seleccionadas fueron de los serogrupos O82 (34 cepas) y O25 (20 cepas) de ISV, O2 (26 cepas) y O25 (45 cepas) de peritonitis, las cuales fueron seleccionadas pues fueron los serogrupos con mayor frecuencia de ambas patologías (Tesis de maestría, Cruz *et al.*, 2012) (Cuadro 1), ya que Romeu *et al.*, (2009) señalan la importancia del antígeno O, al respecto mencionan que aunque no es absoluto existe una fuerte correlación entre el serotipo y la virulencia de la cepa.

Johnson *et al.*, (2007) analizaron la presencia de genes de virulencia en cepas APEC y encontraron que *iss*, *tsh* y *cdtB* se identificaban con mayor frecuencia. Por otra parte Circella *et al.*, (2012) reportaron la presencia de *iucD*, *irp2*, *iss*, *tsh* y *cva/cvi* en cepas APEC. Ramírez *et al.*, (2009) mostraron que los genes de mayor prevalencia en cepas de *E. coli* aisladas de aves reproductoras, incubadora y pollo de engorda fueron *tsh* (62 %) e *iss* (55 %). Con los datos previamente referidos, en este trabajo se propuso buscar la presencia de genes de virulencia asociados a captación de hierro (*irp2*, *iucD*), toxina (*cdtB*), supervivencia al suero (*iss*), adhesina (*tsh*) e invasina (*ipaH*) en cepas APEC aisladas de ISV y peritonitis. Además de ello, se analizó el grupo filogenético (comensales o virulentas) en el

que se ubican estas cepas de *E. coli*, así como su posible correlación con los serogrupos que se aislaron con mayor frecuencia de ambas entidades clínicas.

La detección de genes de virulencia se realizó por ensayos de PCR (Ewers *et al.*, 2004, Ramírez *et al.*, 2009, Navarro *et al.*, 2010), para la realización de este procedimiento se evaluaron 4 técnicas para la extracción del DNA bacteriano (Tiwari *et al.*, 2009; Howard *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014; Madico *et al.*, 1995; Aslam *et al.*, 2003), de ellas se utilizó el procedimiento de obtención del DNA por hervido (Madico *et al.*, 1995; Aslam *et al.*, 2003). Los primeros tres procedimientos analizados resultaron poco efectivos o costosos, aunque, el método de hervido tiene como inconveniente la degradación del DNA a un tiempo corto, sin embargo, es práctico y de bajo costo.

Inicialmente se realizó la amplificación de *tsh*, *iucD*, *irp2*, *cdtB*, *ipaH* e *iss*, con los iniciadores y las condiciones reportadas por Ramírez *et al.*, (Tesis de maestría, 2009). Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron la presencia de amplificadas que no correspondían al número de pb esperados, por lo que se realizó un análisis *in silico* de los iniciadores *tsh*, *iucD*, *irp2*, *cdtB*, *ipaH* e *iss*, para evaluar si las secuencias utilizadas eran las correctas. El resultado de este análisis mostró que la secuencia utilizada para la amplificación de *tsh* no se encontraba en el gene reportado en el Gene Bank y en los otros genes (*iucD*, *irp2*, *cdtB*, *ipaH* e *iss*) algunos de los nucleótidos estaban cambiados o el tamaño de los amplificadas no correspondía a lo esperado. Por ello, se utilizó la secuencia reportada para la *tsh* para diseñar los iniciadores (F-R) con el programa DNAMAN (versión 3) (Huang *et al.*, 2009; Said *et al.*, 2011; Zaker *et al.*, 2011). Para la detección de *iucD*, *irp2*, *cdtB*, *ipaH* e *iss* se utilizaron los iniciadores que originalmente se evaluaron pero ajustando las condiciones para realizar la PCR; para ello se realizó un gradiente de temperatura y diferentes concentraciones de

cloruro de magnesio con lo que se definió la temperatura óptima de alineamiento para cada gen.

En el presente estudio, los resultados obtenidos en la PCR mostraron la presencia de *irp2* e *iucD*, los cuales codifican para los sideróforos yersiniabactina y aerobactina, respectivamente. Ambos genes se identificaron con mayor frecuencia en cepas aisladas de ISV (Figura 2), tal situación se puede explicar por el hecho de que el saco vitelino es rico en lípidos y su contenido de minerales es bajo, además de que esta estructura contiene fosvitina proteína cuya función es mantener los niveles de hierro y calcio en cantidades mínimas en su forma libre (Escorcía, 2011). La función de ambos sideróforos (yersiniabactina y aerobactina) es competir con la fosvitina en la captación de hierro y de esta manera favorecer el desarrollo de la bacteria. Aunque en las cepas APEC aisladas de peritonitis se observó la presencia de *irp2* (63%) e *iucD* (41%), esta fue menor a la observada en las cepas aisladas de ISV *irp2* (94 %) e *iucD* (76%) (Cuadro 4 y Figura 3), sin embargo, en ambas patologías fueron los genes que se presentaron con mayor frecuencia, incluso al analizar los sideróforos por serogrupo, *irp2* presentó una frecuencia mayor en el serogrupo O25 (39% en ISV y 21% en peritonitis) (Figura 3).

De la misma manera, Dissanayake *et al.*, (2014) reportaron que al realizar una búsqueda de genes relacionados con la captación de hierro en cepas de *E. coli* aisladas de aves sanas y enfermas, los genes estaban presentes con mayor frecuencia (96 %) en cepas patógenas, lo que indica que estos se relacionan con la sobrevivencia de esta bacteria en ambientes diferentes al intestino que es su hábitat natural, debido a su potencial redox, pues el hierro está presente en los centros activos de enzimas (superóxido dismutasa, catalasa), los cuales son indispensables en el transporte de electrones, activación del oxígeno, reducción

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, síntesis de aminoácidos, entre otras funciones (Ratledge *et al.*, 2000, Sabri *et al.*, 2006). Por su parte, Rodríguez-Siek *et al.*, (2005b) refieren que la existencia de genes relacionados con la captación de hierro es importante en la colibacilosis aviar, ya que les permite a las bacterias evadir la inmunidad humoral así como la generación de lesiones y la persistencia de cepas APEC (Pourbakhsh *et al.*, 1997).

Un análisis similar, pero considerando las combinaciones presentes en ambas patologías mostró el mismo comportamiento, es decir, una mayor proporción de cepas portadoras de *irp2-iucD-iss* en las cepas aisladas de ISV (41 %) que en las de peritonitis (18 %) (Cuadro 5). Ahora bien, cuando se analiza únicamente al serogrupo O25 presente en ambos cuadros clínicos, éste mostró un comportamiento semejante ya que *irp2-iucD-iss* en las cepas aisladas de ISV fue de 25 % y en peritonitis fue de 22 %, mientras que se observó una asociación del serogrupo O82 con *irp2* e *iucD* (Cuadro 5). Este resultado puede estar relacionado con la escasa presencia de proteínas captadoras de hierro en el peritoneo de las aves, la cual es una membrana serosa formada por tejido conjuntivo laxo con capacidad antimicrobiana mínima. Esta situación da lugar a que los niveles de hierro y minerales no se modifiquen, por lo que no es fundamental que la bacteria exprese dichos sideróforos ([slideshare.net/gretcheins/fisiología-peritoneal](http://slideshare.net/gretcheins/fisiología-peritoneal)), por ejemplo, Li *et al.*, (2005) utilizaron mutagenesis por trasposones para identificar en cepas APEC aquellos genes que participaban en la virulencia utilizando una cepa O2:H5 y encontraron que el LPS, cápsula y sistemas de adquisición de hierro eran esenciales para el proceso de infección de cepas APEC.

Con respecto a *iss* y *tsh*, genes relacionados con la evasión de la respuesta inmune (Zahraei *et al.*, 2013), ambos se identificaron en los dos cuadros clínicos, sin embargo, la presencia de *iss* se observó con una frecuencia mayor en

peritonitis (38%) que en ISV (27%) y el total de cepas positivas a *iss* fue de 74 %, mientras que en *tsh* hubo una menor proporción (8 % en ISV y 11 % en peritonitis), por lo que *tsh* se observó en 21% del total de cepas (Cuadro 4). En relación a nuestros resultados, Timothy *et al.*, (2008) realizaron el análisis de 70 aislados recolectados a partir de diferentes fuentes, 45 de ellos provenientes de aves que murieron durante el periodo de postura, 16 de tracto gastrointestinal de pollos sanos y 9 obtenidos de alimento, agua y basura, del total de cepas APEC entre el 80 y 83% fue positivo para *iss* y 53 a 63% para *tsh*. Paralelamente, Dissanayake *et al.*, (2014) asocian estrictamente a *iss* con casos clínicos y no con cepas comensales. Otro caso más es el reportado por Dozois *et al.*, (2000) en el que identificaron la prevalencia de *tsh* en 300 aislados de APEC (117 pollos, 175 pavos y 8 patos), en un estudio de letalidad en pollos de un día de edad inoculados con la cepa x7122 (*tsh* +) y con una mutante (*tsh* -). La pérdida de *tsh* mostró una disminución significativa en la adhesión lo que sugiere que *tsh* contribuye a la colonización en los sacos aéreos, ya que cuando se reintrodujo *tsh* en la mutante, se reestableció el nivel de adhesión previo. De esta forma demostraron que este gen puede contribuir al desarrollo de las lesiones dentro de los sacos aéreos debido a la deposición de fibrina, sin embargo, también observaron que *tsh* no se requería para la posterior infección generalizada (perihepatitis, pericarditis o septicemia), probablemente por la presencia de los sideróforos que compensan la actividad de *tsh* para degradar la hemoglobina en la sangre y de esta forma se une al grupo hemo; lo cual pudiera explicar los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que *tsh* se identificó en 20 % (ISV) y 23 % (peritonitis) (Cuadro 4). Sin embargo, Trampel *et al.*, 2007 encontraron que ninguna de las cepas (0/4) pertenecientes al serogrupo O111 a partir de cloaca, oviducto y peritoneo fue positiva para *tsh*.

Al relacionar los genes de virulencia con el serogrupo se identificó que *tsh* se agrupaba en O25 e *iss* en O2, la combinación en el serogrupo O25 fue *irp2-tsh-iss*

(10 % en ISV y 13 % en peritonitis), por lo tanto se puede identificar que *tsh* e *iss* está presente con mayor frecuencia en peritonitis (Cuadro 5), lo cual puede deberse a que ambos genes son importantes para la virulencia de la bacteria, ya que *iss* le confiere resistencia al complemento y *tsh*, además de participar en la adherencia a las células huésped, contribuye a la evasión de la respuesta inmune, ya que actúa como proteasa que impide la actividad de CD43 la cual hace los contactos con las células presentadoras de antígeno, lo que resulta en una parálisis de la respuesta leucocitaria a nivel local (Ruiz-Perez *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren con lo reportado por Janben *et al.*, (2001) (85%) y Ramírez *et al.* (2009) (62%), quienes encontraron una mayor frecuencia de cepas positivas para *tsh* y menor de *iss* (55%), mientras que en el trabajo de Rodriguez-Siek *et al.* (2005b) en cepas APEC reportaron una frecuencia similar de *iss* (83%) a lo identificado en este estudio. Sin embargo, el mismo grupo de investigadores observó la presencia de *tsh* en una proporción tres veces más alta (63%) a la identificada por nosotros. En otro estudio en cepas APEC aisladas de onfalitis, salpingitis, enfermedad crónica respiratoria (ERCC) y síndrome de cabeza hinchada, Terezinha *et al.* (2012) identificaron una frecuencia de *tsh* del 28%, lo que coincide con el presente estudio. El hecho de que la frecuencia de *iss* sea similar en todos los estudios, sugiere que es un gene importante para la sobrevivencia de las cepas APEC, independientemente de su origen. Con relación a las variaciones observadas en la presencia de *tsh*, plantea que al tener otros factores involucrados en la adherencia, su ausencia no influye en la capacidad de colonización de la bacteria.

El gen *cdtB* que codifica para toxina de distensión citoletal sólo estuvo presente en una cepa aislada de ISV (Cuadro 4), lo cual no es un hecho extraño ya que en otros trabajos similares dicho gene (*cdtB*) tampoco fue común (Yaguchi *et al.*, 2007). Rodriguez-Siek *et al.*, (2005b) refieren la obtención de este gen (*cdtB*) en cepas APEC a partir de colibacilosis en 1.1% y 8% de cepas UPEC. Lo que

podría estar relacionado con el tipo de patología, ya que en aves ISV y peritonitis son problemas agudos, mientras que *cdtB* se ha identificado en una frecuencia mayor en cepas asociadas a procesos crónicos (Ohara *et al.*, 2004). Así mismo Hinenoya *et al.*, (2014) analizaron la presencia de *cdt* en 102 cepas aisladas partir de heces de vacas, cerdos y aves, en cuyos resultados no encontraron cepas positivas para *cdt* en las muestras de aves.

Rosario *et al.*, (2005) reportaron una frecuencia alta (66%) de *ipaH* en cepas APEC aisladas de ISV; sin embargo, en el trabajo de Ramírez *et al.*, (2009) estas cepas *ipaH+* se clasificaron como no virulentas mediante la prueba de letalidad embrionaria. En nuestro estudio, al analizar 125 cepas APEC, ninguna fue positiva para *ipaH* (Cuadro 4, Figura 9 y 10), un resultado semejante fue reportado por Salehi *et al.*, (2010) quienes analizaron cepas aisladas en codorniz japonesa con colisepticemia. El conjunto de resultados referidos plantea que este gene no contribuye de manera importante en la virulencia de las cepas APEC.

En el presente estudio, la presencia de los genes de virulencia en ISV y peritonitis mostró frecuencias similares para el serogrupo O25 (Figura 9 y 10), posiblemente debido a que como explican Jhonson *et al.* (2006) y Ewers *et al.* (2007), los genes contenidos dentro del plásmido ColV son conservados y se asocian a cepas APEC, lo que sugiere que, en condiciones adversas la bacteria pueden tener la necesidad de colonizar diferentes tejidos y en consecuencia exprese genes que no estaban activos. De acuerdo con lo anterior podría ayudar a explicar los resultados observados en las 3 cepas pertenecientes al serogrupo O2, cuyas cepas no fueron positivas a ningún ge de los que se buscaron, lo que sugiere que quizá tengan otros genes de virulencia, ya que diferentes genes pueden estar ubicados en plásmidos o en cromosoma, por lo cual pudieran ser transmitidos de

manera horizontal y no estar presentes en todas las bacterias de la misma especie.

Escobar-Páramo *et al.*, (2004a) y Clermont *et al.*, (2000) señalan que las cepas ExPEC (entre las que se encuentran las cepas APEC) pertenecen principalmente al filogrupo B2 y algunas al D, en el presente estudio se encontró que 98% pertenecían a los grupos definidos como virulentos extraintestinales (Cuadro 6 y Figura 5), sin embargo, tres de ellas no presentaron ningún gen de virulencia pero se encontraban dentro de estos grupos filogenéticos (Cuadro 6), tal situación pudiera deberse a que posean otros genes de virulencia que no fueron buscados en el presente trabajo, como muestra el trabajo de Sabri *et al.*, 2006 quienes analizaron sistemas de transporte de manganeso *sitABCD* y en la cepa mutada observaron que se podía mantener los niveles de resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya que en algunos sistemas es posible compensar la pérdida de la función de algunos genes.

Los resultados obtenidos en la asociación de los genes de virulencia, grupos filogenéticos y serogrupos con las granjas en las que se alojaban las aves, sugiere una similitud del comportamiento del serogrupo O25 en los dos cuadros clínicos, ubicados en el grupo filogenético B2 y en menor proporción al grupo filogenético D, esto pudiera sugerir una asociación del serogrupo O25 de la granja 1 (aves en crianza) ubicada en el mismo grupo filogenético B2 con las granjas en etapa de producción (peritonitis) (Figura 9 y 10), como lo demostraron Trampel *et al.*, en el 2007, quienes lograron aislar una misma cepa de cloaca, oviducto y peritoneo en gallinas de postura, estas cepas contenían *iroN*, *siT*, *ompT*, *iss*, *iutA* y *traT*, pero a diferencia del presente estudio, esas cepas pertenecían al serogrupo O111 y al grupo filogenético D.

Las cepas de *E. coli* aisladas en el presente estudio se ubicaron en los grupos filogenéticos virulentos B2 y D, que como mencionan Johnson *et al.* (2001) contienen más genes de virulencia, más aún, Carlos *et al.*, (2010) indican que los marcadores *chuA* y *yjaA* se presentan más comúnmente en cepas de humanos, pollos y cerdos.

Jhonson *et al.*, (2005) mencionan que se ha sugerido que las aves son un reservorio de cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales en humanos; por ello Ciccozzi *et al.*, (2013) realizaron una reconstrucción de la filogenia por medio de un análisis de Bayes para conocer el origen y propagación de cepas ExPEC y encontraron que a pesar de que las cepas de aves y humanos estaban ubicadas en los grupos B2 y D, la probabilidad de actuar como cepas zoonóticas era menor.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio los hallazgos sugieren que en la ISV se puede presentar curación clínica pero no biológica, es decir, que en las aves que sobreviven a una ISV las cepas virulentas pudieran permanecer sin causar daño por varias semanas y causar peritonitis por más de 20 semanas después durante la etapa de postura.

## CONCLUSIONES

El análisis de las cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas de ISV y peritonitis mostró que ambas poseían características fenotípicas y genotípicas similares, así como su agrupación en los grupos filogenéticos B2 y D. Sin embargo, para poder corroborar estos hallazgos, es necesario realizar estudios moleculares (PFGE, enzimas multilocus, etc.), para definir la identidad clonal de las cepas aisladas y así definir si, como sugiere el presente estudio, tienen un origen común; lo que de comprobarse, contribuiría a diseñar y establecer medidas de prevención de la peritonitis desde las granjas para reproductoras, incubadoras y durante la etapa de crianza.

## **ABREVIATURAS Y SIGLAS**

Antígeno H: antígeno flagelar

Antígeno K: antígeno capsular

Antígeno O: antígeno somático

APEC: *E. coli* patógeno aviar

CD: célula dendrítica

CDEC: *E. coli* de distención citoletal

DAEC: *E. coli* de adherencia difusa

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: deoxinucleósido trifosfato.

*E. coli*: *Escherichia coli*

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

EDTA: ácido etildiaminotetraacético

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

EPEC: *E. coli* enteropatógena

ERIC-PCR: PCR de secuencia repetida consenso intragénica de enterobacterias

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica

ExPEC: *E. coli* patógena extraintestinal

Filogrupo: grupo filogenético

F: forward

HIP: isla de patogenicidad

ISV: infección de saco vitelino

LB: medio Luria Bertani

LIA: agar hierro lisina

LPS: lipopolisacárido

MIO: motilidad indol ornitina

MP: marcador de peso molecular

NMEC: *E. coli* causante de meningitis neonatal

NRPS: péptido no ribosomal

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: gel de electroforesis en campo pulsado

Pic: proteína implicada en la colonización intestinal

PKS: policétido sintasa

R: reverse

RAP-PCR: PCR de amplificación polimórfica

RNA<sub>m</sub>: ácido ribonucleico con información genética (mensajero)

SG: serogrupo

SIM: motilidad indol sulfuro de hidrogeno

SPATE: serina proteasa autotransportada

TBE: tris borato EDTA

TSI: triple azúcar hierro

UFC: unidades formadoras de colonias

UPEC: *E. coli* uropatógena

UV: ultra violeta

## BIBLIOGRAFÍA

**Abdul-Razzaq** SM, Abdul-Lateef AL, **2011**, Molecular phylogeny of *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Hilla, Iraq, African Journal of Biotechnology 10;70:15783-15787

**Ahmed** HA, Akineden O, Kress C, Estuningsih S, Schneider E, Usleber E, **2007**, Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method, International Journal of Food Microbiology, 116;214–220, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.011

**Aslam** M, Nattress F, Greer G, Yost Ch, Gill C, McMullen L, **2003**, Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle, Applied and environmental microbiology, 69;5:2794–2799

**Aslam** M, Toufeer M, Bravo NC, Lai V, Rempel H, Manges A, Diarra SM, **2014**, Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada, International Journal of Food Microbiology, 177:49–56

**Barnes** HJ, Vaillancourt JP, Gross WB, Colibacillosis, Iowa State Press, 11 Edition, **2003**, 631-656

**Bonacorsi** PPS, Clermont O, Tinsley C, Le GI, Beaudoin Jean-Christophe, Elion J, Nassif X, Bingen E, **2000**, Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains, Infection and Immunity, 68,4:2096–2101

**Carlos** C, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MIZ, Gomes TAT, Amaral LA, Ottoboni LMM, **2010**, *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination, Microbiology, 10:161

**Castañeda** S María del Pilar, Hernández VX, Petrone GVM, Merino GR, Banda CA, Quintana LJA, Fuente MB, Juárez EMA, Alfaro CJC, López CC, Vicente SJL,

Rubio GMA, Sistema de producción animal I, Aves, Volumen 1, 2a Ed, **2005**, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, División Sistema Universidad Abierta y Educación a Distancia (SUA)

**Chaudhuri** RR, Henderson IR, **2012**, The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny, *Infect Genet Evol* 12: 214–226

**Ciccozzi** M, Giufré M, Accogli M, Presti LA, Graziani C, Cella E, Cerquetti M, **2013**, Phylogenetic annalysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* clones isolated from humans and poultry, *New Microbiologica*, 36;385-394

**Circella** E, Pennelli D, Tagliabue S, Camarda A, **2012**, Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* from laying hens in Apulia, southern Italy, *British Poultry Science*, 53;4:465-470

**Clermont** O, Bona CS, Bingen E, **2000**, Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *Appl. Environ Microbiol Appl*, 66: 4555–4558

**Cruz** LL, Flores LJ, Navarro OA, Morales EMR, Hernández CR, Rosario CC, **2012** “Caracterización fenotípica y genotípica ligada a virulencia de cepas de *Escherichia coli* aisladas durante la etapa de crianza y su importancia en la mortalidad causada por Peritonitis en aves de postura”, Congreso AVECAO “Enfrentando nuevos retos en la producción Avícola” 12-14 de Septiembre 2012. Tepatitlán, Jalisco Memorias.

**Dissanayake** DRA, Octavia S, Lan R, **2014**, Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka, *Veterinary Microbiology*, 168:403–412

**Dobrindt** U, Geddam ChM, Krumbholz G, Hacker J, **2010** Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*, *Med Microbiol Immunol*, 199:145–154

**Dozois** CM, Dho-moulin M, Brée A, Fairbrother MJ, Desautels C, Curtiss III R, **2000**, Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region, Infection and Immunity, 68;7:4145–4154

**Dozois** CM, Daigle F, Curtiss R III, **2003**, Identification of pathogen specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Proc. Natl. Acad. Sci., PNAS, 100;1:247–252

**Escobar-Páramo** P, Grenet K, Menách LA, Rode L, Salgado E, Amorin Ch, Gouriou S, Picard B, Rahimy ChM, Andremont A, Denamur E, Ruimy R, **2004a**, Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates, Appl. Environ. Microbiol, 70;9:5698–5700

**Escobar-Páramo** P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Bouguéneq LCh, Denamur E, **2004b**, A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*, Mol. Biol. Evol. 21;6:1085–1094

**Escorcía** MM, El huevo paso a paso, UNAM, FMVZ, DMZA, México D.F. **2011**

**Eslava** CCA, Hernández ChU, **2014**, Molina LJ, Departamento de salud pública, Facultad de Medicina UNAM.

**Estudillo** LJ. Prefacio. En Examen general de calidad profesional para medicina veterinaria y zootecnia: Material de estudio área: aves. Editor Isidro Castro Mendoza. México, D.F. **1996**

**Ewers** C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH, **2004**, Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from poultry colisepticemia, Microbiol Vet, 104;1-2:91-101

**Ewers** C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antao EM, Laturus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, **2007**, Avian pathogenic, uropathogenic and newborn

meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? Int. J. Med. Microbiol, 297;3:163-76

**Ewers C**, Antão EM, Diehl I, Philipp H, Wieler HL, **2009**, Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential, Applied and Environmental Microbiology, 75;1:184–192

**Fialho BO**, Maltempi de Souza E, Dallagassa Cibelle de Borba, Pedrosa Fábio de Oliveira, Klassen G, Irino K, Paludo KS, Araújo de Assis FE, Surek M, Santos FS María de Sousa, Fadel-Picheth TCM, **2013**, Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* using a two-system multiplex-PCR protocol, Journal of Clinical Laboratory Analysis, 27:155–161

**Garénaux A**, Caza M, Dozois MCh, **2011**, The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*, Veterinary Microbiology 153:89–98

**Gordon DM**, Clermont O, Tolley H, Denamur E, **2008**, Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method, Environ Microbiol, 10: 2484–2496

**Hartman BA**, Venkatesan Medwin, Oaks V, Buysse MJ, **1990**, Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*, Journal of Bacteriology, 172;4:1905-1915

**Henderson IR**, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP, **1999**, Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*, Infection and Immunity, 67;11:5587–5596

**Hinenoya A**, Shima Kensuke, Asakura M, Nishimura K, Tsukamoto T, Ooka T, Hayashi T, Ramamurthy T, Faruque SM, Yamasaki S, **2014**, Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan, BMC Microbiology, 14;97

**Howard C. Berg, 2004**, *E coli* in motion, Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering

<http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/estandarizacion-tecnica-elisa-evaluacion-t4540/165-p0.htm>. Fecha de consulta 10 de septiembre 2013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Fecha de consulta 4 de octubre 2013

<http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos>. Fecha de consulta 09 de Diciembre de 2014

<http://www.elfinanciero.com.mx/economia/produccion-avicola-mexicana-crecera-en-este-ano.html>. Fecha de consulta 20 de mayo de 2014

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>. Fecha de consulta 13 de marzo 2014

[http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/ourprofs/ecoli\\_divergente.htm](http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/ourprofs/ecoli_divergente.htm). Fecha de consulta 13 de marzo 2014

<http://www.slideshare.net/gretcheins/fisiología-peritoneal>. Fecha de consulta 11 de junio 2013

**Huang X, Hao-ming L, 2009**, Cloning and bioinformatic analysis of lovastatin biosynthesis regulatory gene *lovE*, Chin Med J, 122;15:1800-1805

**Janben T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp HC, Wieler LH, 2001**, Virulence genes associated with avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry had died from colibacillosis, Int J Med Microbiol, 291;5:371-8

**Jinadasa NR, Bloom ES, Weiss SR, Duhamel EG, 2011**, Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages, Microbiology, 157, 1851–1875

**Johnson** JR, Stell AL, **2000**, Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise, *Infectious Diseases*,181:261–72

**Johnson** JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL, **2001**, Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*, *J Infect Dis*, 183:78-88

**Johnson** TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK, **2005**, DNA Sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49;11:4681–4688

**Johnson** JT, Johnson JS, Nolan LK, **2006**, Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that It evolved from closely related ColV virulence plasmids, *Journal of Bacteriology*,188;16:5975–5983

**Johnson** JT, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamele P, Johnson JS, Doetkott C, Skyberg AJ, Lynne MA, James R. Johnson RJ, Nolan LK, **2007**, The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes, *Journal of Bacteriology*, 189;8:3228–3236

**Kostakioti** A, Stathopoulos Ch, **2004**, Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain, *Infection and Immunity*, 72;10:5548–5554

**Li** G, Laturus C, Ewers Ch, Wieler LH, **2005**, Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis, *infection and Immunity*, 73;5:2818–2827.

**Li** P, Zhao Z, Wang Y, Xing H, Parker MD, Yang Z, Baum E, Li W, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Li S, Yan G, Cui L, Fan Q, **2014**, Nested PCR detection of

malaria directly using blood filter paper samples from epidemiological surveys, *Malaria Journal*, 13:175

**Ling J**, Pan H, Gao Q, Xiong L, Zhou Y, Zhang D, Gao S, Xiufan Liu X, **2013**, Aerobactin synthesis genes *iucA* and *iucC* contribute to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058, *PLoS ONE*, 8;2:e57794

**Lobersli I**, Haugum K, Lindstedt Bjorn-Arne, **2012**, Rapid and high resolution genotyping of all *Escherichia coli* serotypes using 10 genomic repeat-containing loci, *Journal of Microbiological Methods*, 88;134–139

**Lynne AM**, Foley SL, Nolan LK, **2006**, Immune response to recombinant *Escherichia coli* Iss protein in poultry, *Avian Diseases*, 50;2:273–276

**Madico G**, Akopyants NS, Berg DE, **1995**, Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by using templates from boiled cultures, *Journal of Clinical Microbiology*, 33;6:1534–1536

**Miller MC**, Fetherston JD, Pickett CL, Bobrov AG, Weaver RH, DeMoll E, Perry RD, **2010**, Reduced synthesis of the Ybt siderophore or production of aberrant Ybt-like molecules activates transcription of yersiniabactin genes in *Yersinia pestis*, *Microbiology*, 156:2226–2238

**Moreno E**, Prats G, Planells I, Planes AM, Pérez T, Andreu A, **2006**, Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 24;8:483-9

**Nataro JP**, Kaper JB, **1998**, Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clinical microbiology Reviews*, 11;1:142–201

**Nathan S**, **2014**, New to *Galleria mellonella* modeling an ExPEC infection, *Virulence* 5:3, 371–374

**Navarro A**, Eslava C, Perea LM, Alma Inzunza A, Gabriela Delgado A, Espinosa MR, Thomas Cheasty T, Cravioto A, **2010**, New enterovirulent *Escherichia coli*

serogroup 64474 showing antigenic and genotypic relationships to *Shigella boydii* 16, Journal of Medical Microbiology, 59, 453–461

**Nelwike** TH, Lebeer S, Gwakisa PS, Goddeeris BM, **2012**, Identification of avian pathogenic *Escherichia coli* genes that are induced in vivo during infection in chickens, Appl. Environ. Microbiol, 78;9:3343–3351

**Nolan** LK, Horne SM, Giddings CW, Foley SL, Jhonson TJ, Lynne AM, Skyberg J, **2003**, Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*; Veterinary Research Communications;27:101-110

**Oh** JY, Kang MS, Yoon H, Choi HW, An BK, Shin EG, Kim YJ, Kim MJ, Kwon JH, Kwon YK, **2012**, The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes, Poultry Science, 91;370-375 doi:10.3382/ps.2011-01807

**Ohara** M, Oswald E, Suga M, **2004**; Cytolethal distending toxin: A bacterial bullet targeted to nucleus, J. Biochem. 136; 4:409-413

**Porcheron** G, Garénaux A, Proulx J, Sabri M, Dozois MCh, **2013**, Iron, copper, zinc, and manganese transportand regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence, Frontal. Celular. Infect. Microbiol, 3;90

**Pourbakhsh** SA, Dho-Moulin M, Bree A, Desautels C, Martineau-Doize B, Fairbrother JM, **1997**, Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*, Microb. Pathog, 22:331–3411997

**Provence** DL, Curtiss R III, **1994**, Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain, Infection and Immunity, 62;4:1369-1380

**Quintana** LA, Juárez EMA, Merino GR, Fuente MB, Hernández VX, Petrone GVM, Alfaro CJC, Rubio GME, Gómez VG, Rosario CC, Tejeda PA, Mejoramiento animal, 2a Edición, México, SUA, FMVZ, UNAM, **2005**

**Ramírez** BGA, **2009**, Asociación entre letalidad y presencia de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aves. (Tesis de Maestría). México, D.F. FMVZ.UNAM.

**Ratledge** C, Dover LT, **2000**, Iron Metabolismo en pathogenic bacteria, Annual Review of Microbiology, 54: 881-941 doi: 10.1146 / annurev.micro.54.1.881

**Rodriguez-Siek** EK, Giddings WC, Doetkott C, Johnson JT, Fakhr KM, Nolan LK, **2005b**, Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis, Microbiology, 151; 2097–2110

**Romeu** AB, Hernández RN, Moya LD, Eslava CC, Salazar JEP, Navarro A, **2009**, Evaluación de la presencia de cepas enterovirulentas de *Escherichia coli* en ecosistemas dulceacuícolas de la Ciudad de La Habana, Memorias del Taller en saludo al día del Medio Ambiente.

**Rosario** CC, Téllez IG, López CC, Villaseca FJM, Anderson RC, Eslava CC, **2004a**. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs, and neonatal broilers with yolk sac infection, Rev Latinoam Microbiol;46(1-2):12-16.

**Rosario** CC, López CC, Téllez IG, Navarro OA, Anderson RC, Eslava CC, **2004b** 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 Diseases, 48:791-802.

**Rosario** CC, Puente JL, Verdugo-Rodríguez A, Anderson RC, Eslava CC, **2005** Phenotypic characterization of *ipaH+* *Escherichia coli* strains associated with yolk sac infection, Avian Diseases, 49:409-417

**Ruiz-Perez F**, Wahida R, Fahertya ChS, Kolappaswamy K, Rodriguez L, Santiago A, Murphy E, Cross A, Sztejn MB, Nataro JP, **2011**, Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins, PNAS, 108;31: 12881–12886

**Sabri M**, Lé veillé S, Dozois ChM, **2006**, A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide, Microbiology, 152:745–758

**Said AK**, Cao Y, Dian-Jun W, **2011**, Int J Mol Epidemiol Genet, 2;4:339-353

**Salehi M**, Ghanbarpour R, **2010**, Phenotypic and genotypic properties of *Escherichia coli* isolated from colisepticemic cases of Japanese quail, Trop Anim Health Prod, 42:1497–1504

**Terezinha Knobl**, Moreno AM, Paixao R, Tardelli GTA, Midolli VMA, Leite Domingos da Silva, Blanco EJ, Piantino FAJ, **2012**, Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring *sfa* gene in Brazil, The Scientific World Journal, Article ID 437342, 7

**Thiem DV**, Sethabutr O, Seidlein LV, Tung VT, Canh GD, Chien TB, Tho HL, Lee H, Hounng Huo-Shu, Hale LT, Clemens DJ, Mason C, Trach DD, **2004**, Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam, Journal of Clinical Microbiology, 42;5: 2031–2035

**Timothy S**, Shafi K, Leatherbarrow AH, Jordan FTW, Wigley P, **2008**, Molecular epidemiology of a reproductive tract-associated colibacillosis outbreak in a layer breeder flock associated with atypical avian pathogenic *Escherichia coli*, Avian Pathology, 37;4:375-378

**Tiwari RP**, Hoondal GS, Tewari R, Laboratory Techniques in Microbiology & Biotechnology, Abhishek Publications Chandigarh. India, **2009**

**Torre** MMC, Fonseca MP, Quintana LJA. El Huevo: Mitos, Realidades y Beneficios. 2a ed. Instituto Nacional Avícola, México, D.F. **2008**

**Trampel** DW, Wannemuehler Y, Nolan LK, **2007**, Characterization of *Escherichia coli* isolates from peritonitis lesions in commercial laying hens, Avian Diseases, 51:840–844

**Wiles** JT, Kulesus RR, Mulvey AM, **2008**, Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*, Experimental and Molecular Pathology 85:11–19

**Yaguchi** K, Ogitani T, Osawa R, Kawano M, Kokumai N, Kaneshige T, Noro T, Masubuchi K, Shimizu Y, **2007**, Virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated pathogenic avian colisepticemia in chickens with Japan, Avian Dis, 51;3:656-62

**Zahraei** ST, Derakhshandeh A, Tadjbakhsh H, Karimi V, **2013**, Comparison and phylogenetic analysis of the *iss* gene in two serogroups of avian pathogenic *E. coli* isolates of predominant avian colibacillosis in Iran, Res Vet Ciencia, 94;1:5-8

**Zaker** BS, Mehdi Shekarabei M, Nojoumi SA, Jabbarzadeh E, Ghalami M, Molla KV, Gholi BM, Karim RM, Bossak M, Romanovich SE, Konstantina SL, Mikhaelovna ZA, Slizen V, Petrovich TL, **2011**, Study of genetic evolution in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with active pulmonary tuberculosis in the Iran and Belarus, The Open Microbiology Journal, 5:32-42