



01694

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

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

**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CEPAS DE *Escherichia  
coli* AISLADAS EN AVES CON INFECCIÓN DEL SACO  
VITELINO**

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A**

**CECILIA ROSARIO CORTÉS**

**TUTOR.:**

**CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS**

**COMITÉ TUTORAL:**

**ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ**

**JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA**

**MÉXICO, D.F.**

**2005**



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reespecial.

NOMBRE: Cecilia Rosario Cortés

FECHA: 09/Nov/05

FIRMA: 

**DECLARACIÓN**

La tesis es el resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indique lo contrario, dándose reconocimiento a las fuentes de información consultadas. El autor da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

---

**MVZ MPA CECILIA ROSARIO CORTÉS**

**Prosigue ... Si espinas te da el escenario,**

**recuerda la historia sublime de Dios ...**

**Para ir a la gloria se sube al Calvario ...**

**JAMÁS HA VENCIDO QUIEN NUNCA LUCHÓ.**

**Antonio Plaza**

**(Fragmento)**

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Por todo lo que sin merecer he recibido de su mano generosa, principalmente la vida y a los mejores padres. Gracias por la oportunidad de concluir esta etapa y estar siempre junto a mí.

### **A MIS PADRES**

Por ser la base de todos mis logros ya que con su ejemplo de honradez, rectitud, honestidad y deseos de superación han marcado mi vida. Nunca podré agradecerles lo suficiente por todo lo que me han dado y por amarme a pesar de todos mis defectos y mis errores. Esta tesis marca el final de una etapa que no hubiera sido posible concluir sin su apoyo. Aunque no lo diga muy frecuentemente, ustedes saben que son las personas que más amo en el mundo. Espero poder retribuir aunque sea un poquito todo lo que ustedes me han dado. Los Amo.

### **A MI HERMANO LUIS MANUEL**

A mi muy querido hermano, porque a pesar de las diferencias que hay entre nosotros, existe algo más fuerte que es el cariño y agradecimiento hacia ti; porque sé que puedo recurrir a ti cuando lo necesito y principalmente porque junto a Mary me has dado tres de las más grandes alegrías de mi vida

### **A MIS SOBRINOS JOSÉ MANUEL, LUIS DANIEL Y MARIANA**

Por ser la alegría de la casa, y porque con su cariño me han ayudado a ser mejor. Son ustedes mis tres grandes tesoros. Aunque cada uno es distinto, todos son parte importante de mi corazón. Espero que se sientan tan orgullosos de mí como yo lo estoy de cada uno de ustedes.

### **A MIS TÍOS Y PRIMOS**

A todos ellos con gran cariño y respeto, pero principalmente a mis tíos Queta y Diego porque tanto a Luis Manuel como a mí nos han demostrado un cariño de hijos. En esta ocasión quiero dedicar este trabajo a un ser que desde pequeño ha sido la alegría de nuestra familia, y que es una de las mejores personas que he conocido: Con mucho cariño para Miguel Ángel Vázquez Jiménez. Todos te queremos y estamos contigo. Que Dios te bendiga!

### **A MIS AMIGOS**

Rosalía, Luis, Pily, Rubén, Laura, Krimy, Chucho, Gerardo Nava, Norma, Ely Abrego, Y a la nueva integrante del alegre grupo María José!

### **DICINA**

### **CON CARIÑO**

A todos aquellos cuyo nombre no recuerdo en este momento y que a lo largo de mi vida me han apoyado. A todos los que han estado a mi lado, por su cariño, mil gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A la Universidad Nacional Autónoma de México**

Por ser una gran institución que abre sus puertas a todo aquel que este dispuesto superarse y a ser una mejor persona. Por permitirme formar parte de ella y poner mi granito de arena para que siga siendo NUESTRA MAXIMA CASA DE ESTUDIOS.

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**

Por brindarme la oportunidad de recibir la beca, gracias a la cual pude realizar los estudios de Maestría y Doctorado.

### **Al Departamento de Producción Animal: Aves**

Por darme la oportunidad formar parte de su equipo y crecer profesionalmente. Espero seguir contribuyendo a su crecimiento!

### **Al Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina**

Especialmente al **Dr. Carlos A. Eslava Campos**, mi tutor, pero ante todo amigo. Gracias Doctor Eslava por apoyarme incondicionalmente, darme la oportunidad de trabajar con usted y enseñarme que trabajando en equipo podemos lograr mucho. En verdad es un privilegio conocerlo y trabajar con Usted.

### **Al comité tutorial**

**Dr. José Luis Puente García** y **Dr. Antonio Verdugo Rodríguez**. Gracias por todo el apoyo que he tenido de ustedes, y por sus grandes conocimientos que me han ayudado a finalizar este proyecto. Espero que continuemos trabajando juntos en proyectos futuros.

### **A los miembros del jurado**

**Dr. Ernesto Ávila González**, **Dr. Antonio Verdugo Rodríguez**, **Dr. José Luis Puente García**, **Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca**, **Dr. Rogelio Alonso Morales**, **Dr. José Antonio Quintana López** y **Dr. Carlos A. Eslava Campos**. Por enriquecer con sus conocimientos y comentarios esta tesis, por su gran confianza y gran calidad humana.

## RESUMEN

Setenta y seis serotipos de *Escherichia coli ipaH+* fueron caracterizados. Mediante la identificación bioquímica se mostraron reacciones positivas a la lactosa (100% de las cepas), lisina decarboxilasa (98.7% de las cepas), y motilidad (67.1% de las cepas), propiedades que no corresponden las descritas para el grupo enteroinvasivo. Los serogrupos más frecuentes fueron O2 (n=20), OR (n=11) y el antígeno O no determinado (n= 10). El serotipo O2:NM fue el más común. El 66% (n= 50) de las cepas de *E. coli ipaH+* produjeron colicinas; 26 (34%) produjeron Col V y otros tipos de colicinas, 13 (17%) colicinas diferentes a la Col V y 11 (14.5%) únicamente Col V. La mayor resistencia antimicrobiana fue a trimetoprima/sulfa (72%), ampicilina (64.5%), enrofloxacin (55.3%), y ciprofloxacina (47.4%); con 25 patrones de resistencia múltiple en 66 (86.8%) cepas. La concentración inhibitoria mínima mostró que la mayoría de las cepas fueron sensibles a concentraciones bajas de gentamicina y kanamicina y resistentes a la tetraciclina. En la prueba de invasividad hubo cambios en la forma y la tinción de las células, y desprendimiento parcial de la monocapa en la mayoría de los aislamientos. Quince de las cepas invadieron más del 30% de la monocapa, con proyecciones de tipo filipoidal. La ribotipificación mostró cuatro grupos principales, donde el cuarto fue el más homogéneo compuesto básicamente por cepas O2. Mediante PCR, utilizando iniciadores de la *IS630*, únicamente ocho cepas fueron positivas. Los ensayos de letalidad en embrión de pollo mostraron que la cepa 095785, representativa del cluster cuatro, produjo una mortalidad del 86.6%, y clasificada como virulenta. Adicionalmente, ésta presentó un crecimiento aproximadamente dos logaritmos ( $8.25 \pm 0.39$ ) arriba del testigo negativo ( $6.89 \pm 0.92$ ). Los resultados sugieren la existencia de clones específicos de *E. coli* invasivos adaptadas al hospedero aviar. De acuerdo con la información disponible, este es el primer estudio que demuestra la presencia de cepas invasivas extraintestinales de *E. coli* (ExIEC) en aves.

Palabras clave: *Escherichia coli*, infección del saco vitelino, invasividad, resistencia a antibióticos, factores de virulencia, ribotipificación, ensayo de letalidad embrionaria.

## SUMMARY

Seventy-six *Escherichia coli ipaH+* were characterized. Biochemical identification of our strains shows positive reactions for lactose fermentation (100% of strains), lysine decarboxylase (98.7% of strains) and motility (67.1% of strains) properties that do not correspond with those described to the EIEC group. Regarding the serotyping, the most common O antigens were O2 (n= 20), OR (n= 11) and non-determined O? (n= 10). The O2:NM serotype was the most common. Sixty-six percent (n = 50) of the *ipaH+* *E. coli* produced colicins, of them, 26 (34%) produced Col V and other colicins, 13 (17%) produced colicins other than Col V, and 11 (14.5%) produced Col V only. Trimethoprim/Sulfa (72%), ampicillin (64.5%), enrofloxacin (55.3%), and ciprofloxacin (47.4%) were the major antimicrobial resistance frequencies observed. Twenty-five different multiresistance patterns were observed, where sixty-six strains (86.8%) were included. A MIC test showed that most of the strains were sensitive to low gentamicin and kanamycin concentrations, whereas most of the strains were resistant to tetracycline. An invasiveness assay showed that the predominant alterations were changes in shape and staining, and in most of the specimens, a partial monolayer detachment was also seen. Fifteen strains invaded more than 30% of the monolayer cells, causing the formation of intercellular bridges or filipoidal-like protrusions. Ribotyping showed four main clusters, being the last one the most homogeneous, basically formed by O2 strains. Using PCR with the *IS630* primers only eight isolates were positives. In the embryo lethality assay 095785 strain, a representative isolate of the fourth cluster, produced mortality in the 86.6% embryos, consequently, was classified as a virulent strain. Additionally, it presented the highest growth ( $8.25 \pm 0.39$ ), almost twice more than negative control ( $6.89 \pm 0.92$ ). The results suggest the existence of specific clone complexes derived from EIEC strains adapted to the avian host. To our knowledge, this is the first study that demonstrates the presence of extraintestinal invasive *E. coli* (ExIEC) strains.

Key words: *Escherichia coli*, yolk sac infection, invasiveness, antibiotic resistance, virulence factors, rybotyping, embryo lethality essay.



## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. Introducción General</b>	
a. <i>Escherichia coli</i>	1
b. <i>Escherichia coli</i> en aves	1
c. Infección del saco vitelino (ISV)	2
d. <i>Escherichia coli</i> en humanos	2
e. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	3
f. Determinación de virulencia en <i>Escherichia coli</i>	4
g. Ribotipificación	4
h. Justificación	5
i. Objetivos	6
<b>2. Material y Métodos</b>	
a. Cepas bacterianas	7
b. Ribotipificación	7
c. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	8
d. Modelo de letalidad en embrión de pollo	9
e. Ensayo de crecimiento bacteriano en embrión de pollo	10
<b>3. Resultados</b>	
a. Ribotipificación	12
b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	13
c. Modelo de letalidad en embrión de pollo	14
d. Ensayo de crecimiento bacteriano en embrión de pollo	14
<b>4. Discusión</b>	16
<b>5. Conclusiones</b>	26
a. Perspectivas	26
<b>6. Referencias</b>	27
<b>7. Anexos</b>	
a. Rosario CC, Téllez IG, López CC, Villaseca FJ, Anderson RC, Eslava CC. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs and neonatal broilers with yolk sac infection. Rev Latinoam Microbiol 2004-1; 46: 12-16.	

- b. 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 chicken with yolk sac infection. *Avian Dis* 2004; 48: 791-802.
- c. Phenotypic characterization of *ipaH+* *Escherichia coli* strains associated with yolk sac infection. C. C. Rosario, J. L. Puente, A. Verdugo-Rodriguez, R. C. Anderson, and C. C. Eslava. *Avian Dis* 49:409–417, 2005.

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1. Distribución de los embriones de pollo de diferentes edades para determinar la edad de inoculación</b>	<b>38</b>
<b>Cuadro 2. Esquema de inoculación en el ensayo de letalidad en embrión de pollo</b>	<b>39</b>
<b>Cuadro 3. Ribogrupos identificados en 52 cepas de <i>Escherichia coli ipaH+</i> aislados a partir de aves con infección del saco vitelino</b>	<b>40</b>
<b>Cuadro 4. Cepas de <i>E. coli</i> aisladas a partir de aves con infección del saco vitelino positivas a la prueba de PCR para IS630</b>	<b>42</b>
<b>Cuadro 5. Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de letalidad en embriones de pollo, inoculados a 4 diferentes edades de incubación con tres cepas de <i>Escherichia coli</i></b>	<b>44</b>
<b>Cuadro 6. Modelo de crecimiento bacteriano en embriones de 12 días de edad inoculados con tres cepas de <i>Escherichia coli</i> (K-12, CR-000089 y FM-095785).</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Dendograma de los ribogrupos encontrados en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aves con Infección del saco vitelino** 41
- Figura 2. Productos de PCR para los iniciadores obtenidos de *IS630*** 43
- Figura 3. Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de letalidad en embriones de pollo, inoculados a 4 diferentes edades de incubación con tres cepas de *Escherichia coli*** 45
- Figura 4. Modelo de crecimiento bacteriano en embriones de pollo a los 12 días de incubación inoculados con tres cepas de *Escherichia coli* (K-12, CR-000089, FM-095785).** 47
- Figura 5. Embriones inoculados con diferentes cepas de *Escherichia coli* a los 12 días de incubación.** 48

# CAPITULO 1

## INTRODUCCIÓN

### a. *Escherichia coli*

*Escherichia coli*, integrante de la familia Enterobacteriaceae, considerado el microorganismo predominante de la biota intestinal (1, 2, 3, 4) puede permanecer por largo tiempo sin causar efecto adverso alguno; sin embargo, algunas clonas han adquirido la capacidad de producir una amplia gama de enfermedades, tanto en el hombre como en los animales (1, 5).

### b. *E. coli* en Aves

En las aves, *E. coli* tiene gran importancia; por ser uno de los patógenos bacterianos que se aísla con mayor frecuencia (6), además de ser considerado como responsable de al menos 5% de la mortalidad en las parvadas comerciales, por lo que ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria avícola (7, 8, 9, 10). En los Estados Unidos se calcula que éstas pueden sobrepasar los cien millones de dólares anuales (7, 8, 11).

Actualmente las cepas patógenas aviares de *E. coli* se reúnen dentro del grupo APEC (por las siglas en inglés de Avian Pathogenic *Escherichia coli*) (6, 9, 12, 13, 14, 15). Entre las propiedades relacionadas con la virulencia de las cepas APEC están la producción de colicina V (Col V), expresión de la fimbria tipo F1, letalidad embrionaria, presencia de la proteína Iss (increased serum survival), hemaglutinina termosensible Tsh, resistencia al complemento, presencia de cápsula, sistema quelante de hierro aerobactina, producción de toxinas y citotoxinas, así como la pertenencia a serotipos específicos (9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Por otra parte, se ha reportado que el grupo APEC se encuentra básicamente compuesto por serotipos clásicos de los grupos diarreagénicos EPEC y ETEC (21)

Frecuentemente, las cepas patógenas de *E. coli* se encuentran en las casetas donde se crían las aves y son causantes de enfermedades tales como aerosaculitis, pericarditis, peritonitis, salpingitis, sinovitis, osteomielitis, celulitis, onfalitis e infección del saco vitelino (ISV) (9, 20, 22, 23, 24, 25, 26).

### **c. Infección del Saco Vitelino (ISV)**

Particularmente, la ISV afecta a todas las aves, aunque se observa con mayor frecuencia en pollos y pavos debido a las condiciones intensivas de incubación (24). Es considerada una enfermedad de gran importancia económica, ya que se presenta en todas las parvadas y representa una de las principales causas de mortalidad en pollos durante la primera semana de vida (27, 28, 29, 30). Así mismo, también se ha relacionado con disminución de la incubabilidad, reducción de los nacimientos en la incubadora, así como un incremento en el número de pollos desechados por retraso en el crecimiento (31).

A pesar de que se han aislado una gran cantidad de géneros bacterianos a partir de aves con ISV, la más común es *E. coli* (24, 27, 28, 29, 32). Harry (1957), aisló *E. coli* en el 82% de las aves con cambio en el saco vitelino, así como en el 52% de los que no mostraban cambios.

Aunque por muchos años se había considerado a las cepas asociadas a ISV como ambientales apatógenas o de baja virulencia (15, 22, 23), recientemente se demostró la presencia de genes de virulencia tales como *ipaH* (característico del grupo EIEC) en aislamientos de aves con ISV; el cual fue encontrado en una elevada proporción (30%) (34); sin embargo, la mayoría de estas cepas no pertenecían a los serogrupos reportados previamente dentro del grupo EIEC (34).

### **d. *E. coli* en Humanos**

De manera similar en el caso de los humanos, *E. coli* ocasiona una gran variedad de padecimientos en el hombre (2), tales como diarrea, disentería, síndrome urémico hemolítico, infecciones renales y vesicales, septicemia, neumonía y meningitis (1). Esta versatilidad está relacionada principalmente con la habilidad de las cepas para adquirir diversos genes de virulencia y no al hecho de pertenecer a un determinado género o especie, como se postuló por largo tiempo (1, 2).

Al menos cinco grupos han sido descritos dentro de las cepas causantes de diarrea en humanos; Enteropatógena (Enteropathogenic *Escherichia coli*: EPEC), Enterotoxigénica (Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC), Enteroagregativa (Enteroggregative *Escherichia coli*: EAEC), Enterohemorrágica (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC)

y Enteroinvasiva (Enteroinvasive *Escherichia coli*: EIEC) (1, 4, 5).

**e. *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

Las cepas EIEC están genética y bioquímicamente relacionadas con *Shigella* spp., ambas son lisina descarboxilasa negativas, no móviles, y lactosa negativas, además de invadir células epiteliales y elaborar enterotoxinas, las cuales juegan un papel muy importante en la patogénesis de la diarrea (1, 2).

A pesar de que no se ha esclarecido totalmente la patogénesis de *Shigella* spp. y EIEC, se han propuesto cinco pasos fundamentales: (i) penetración en la célula epitelial, (ii) lisis de la vacuola endocítica, (iii) multiplicación intracelular, (iv) movimiento direccional a través del citoplasma, y (v) invasión a las células epiteliales adyacentes (1).

La detección de *Shigella* spp. y EIEC se realiza a partir de muestras fecales de pacientes infectados mediante el uso de medios selectivos, seguida de la identificación por medios bioquímicos y serológicos. Sin embargo, estos métodos tradicionales no solo requieren tiempo, sino personal experimentado para llevar a cabo el aislamiento e identificación bacteriana de modo preciso (35). Los avances recientes en biología molecular, han permitido el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, rápidos y sensibles, mediante la detección de ADN específico del patógeno en los especímenes clínicos sin la necesidad de realizar el aislamiento (36). Para la identificación de *Shigella* y EIEC han sido desarrolladas diversas sondas, las cuales son utilizadas en la hibridación de ADN o PCR (35).

Uno de los ensayos más populares de PCR se basa en la amplificación de la secuencia para el antígeno del plásmido de invasividad H (invasión plásmid antígeno H, *ipaH*). A pesar de que se desconoce su función, este gen ha sido encontrado en las cuatro especies de *Shigella*, así como en las cepas EIEC (37, 38) en multicopias, tanto en el plásmido de invasividad como en el cromosoma (39).

El antígeno O de *Shigella* y otras enterobacterias, está codificado en genes organizados dentro del operón *rfb* (35). En la mayoría de las enterobacterias este operón se encuentra dentro del cromosoma; sin embargo, en el caso de *S. sonnei* se encuentra dentro del plásmido de virulencia. En este operón se ha determinado la presencia de una secuencia

de inserción denominada IS630; a partir de la cual se desarrollaron los iniciadores HS61 y HS62 los cuales han sido utilizados para la detección de cepas invasivas mediante la prueba de PCR (40).

### **Determinación de Virulencia en *E. coli***

Por otra parte, el control de la colibacilosis en las aves se ha dificultado, ya que no se cuenta con una prueba para determinar si los aislamientos que se realizan a partir de las muestras clínicas son patógenos primarios (cepas altamente virulentas), patógenos secundarios (medianamente virulentas) o bien apatógenos (avirulentas) (18, 41). Con el objetivo de determinar la virulencia de *E. coli*, se han descrito varios métodos de inoculación en aves de diferentes edades. Dias da Silveira *et al.*, (2002-2), inocularon aves de un día de edad por vía subcutánea en el cuello, mientras Chaffer *et al.* (1999) utilizan la inoculación por vía subcutánea, en aves de 21 días. Otros trabajos han recurrido al empleo de embriones de pollo con el mismo fin (18, 41, 43, 44). Wooley *et al.*, (2000) llevaron a cabo la inoculación de embriones de pollo y lograron demostrar su utilidad para determinar la virulencia de las cepas aviares de *E. coli*.

### **Ribotipificación**

Recientemente, algunas técnicas de biología molecular han sido aplicadas en investigaciones epidemiológicas, mediante la detección directa de variaciones en las secuencias de nucleótidos en el ADN cromosomal de los aislamientos bacterianos (45). Las técnicas de referencia para el agrupamiento filogenético, incluyen la electroforesis de multilocus enzimático (MLEE) y la ribotipificación, ambas, técnicas complejas y laboriosas (5).

Los patrones de restricción de genes del ARNr, conocido como ribotipificación, han sido de gran utilidad para la identificación de especies, así como para la tipificación epidemiológica. De hecho, la ribotipificación ha sido usada por diversos investigadores para determinar la relación clonal existente entre algunas cepas bacterianas, así como para rastrear la fuente de contaminación fecal en alimentos y agua (46).

La naturaleza conservada de los genes de ARNr permiten el uso de un solo juego de



sondas para la visualización de los patrones de restricción de los genes del ARNr (ribotipos) de bacterias con cualquier posición filogenética (45, 47, 48). Esta técnica, se basa en el análisis de fragmentos genómicos generados por una digestión con enzimas de restricción de los operones de ARNr. Las regiones más conservadas de los operones permiten identificar el género y especie de una bacteria, mientras que las regiones variables y de los flancos permiten discriminar entre cepas de la misma especie (47). Debido a la estabilidad de los ribotipos a través del tiempo y ser marcadamente reproducibles, ha sido posible el empleo de la ribotipificación para la identificación y caracterización de bacterias.

A pesar de ser una técnica compleja, en la actualidad existen a escala comercial equipos como el RiboPrinter® Microbial Characterization System de DuPont, capaces de realizar el proceso completo en 8 horas. Al ser una técnica automatizada y estandarizada, el sistema de caracterización microbiana RiboPrinter® es adecuado para llevar a cabo la tipificación rápida de un gran número de cepas bacterianas. El sistema puede producir 32 ribotipos en un día a partir de colonias frescas (47, 48). Adicionalmente, debido a la amplia distribución e interconexión de los *Riboprinters*, es posible la comparación inmediata de ribotipos a través de la conexión de diferentes bases de datos (5). El sistema de identificación incluye en su base de datos alrededor de 4800 patrones, los cuales cubren más de 120 géneros y 1100 especies bacterianas. Dentro de ellas están las especies de mayor importancia dentro de la industria farmacéutica, salud pública e inocuidad alimentaria, además de bacterias ácido lácticas.

### **Justificación**

Debido a la importancia de las colibacilosis en México, se han realizado algunos trabajos en donde se identificaron cepas de *E. coli*, a partir de muestras obtenidas en granjas de reproductoras, incubadora y pollo de engorda. Los resultados de este trabajo sugieren que la contaminación bacteriana causante de la ISV su origen no se presenta en las granjas de reproductoras (32) (Anexo A). Adicionalmente, los serotipos predominantes en México eran diferentes a los reportados en otros países como patógenos para las aves. Sin embargo, el hallazgo más importante fue el número elevado de cepas positivas al gen *ipaH* (72%), característico de las cepas EIEC, en un ensayo de hibridación (34) (Anexo B). Este

hallazgo reviste una gran importancia pues las bacterias del grupo EIEC habían sido aisladas únicamente a partir de humanos y primates superiores; por esta razón, fue necesario llevar a cabo la demostración de la capacidad invasiva de las cepas *ipaH*<sup>+</sup>. Por otro lado, se determinaron las características fenotípicas de las cepas *ipaH*<sup>+</sup> aisladas a partir de aves, así como la relación clonal de éstas; finalmente, se demostró que las cepas estudiadas son capaces de producir lesiones similares a las observadas en el campo utilizando un modelo de embrión de pollo.

### **Objetivos**

Determinar la capacidad invasiva de las cepas *ipaH*<sup>+</sup> aisladas a partir de muestras procedentes de aves.

Realizar la caracterización fenotípica de las cepas *ipaH*<sup>+</sup> aisladas a partir de aves con infección del saco vitelino.

Determinar la relación clonal entre cepas de *Escherichia coli ipaH*<sup>+</sup> en aves.

Determinar la virulencia de una cepa *ipaH*<sup>+</sup> representativa en un modelo de letalidad en embriones de pollo.

## CAPITULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Cepas Bacterianas.** Las cepas fueron aisladas a partir de diferentes muestras obtenidas en granjas de reproductoras, incubadoras y pollo de engorda, e identificadas como *E. coli* (32). De un total de 267 cepas se seleccionaron 76, de las cuales 68 fueron *ipaH*<sup>+</sup> en los ensayos de hibridación y 8 pertenecían a serogrupos reportados como enteroinvasivos (34).

Durante la realización de la prueba de PCR para *IS630* se utilizaron las cepas de *E. coli* O28ac EIEC y *S. sonnei* I como testigos positivos; y una cepa de *E. coli* del grupo EAEC como testigo negativo. Mientras que para llevar a cabo el ensayo del modelo de letalidad en embriones de pollo se incluyeron la cepa HB101 (K-12) como testigo negativo; y CR-000089 del cepario del DPA: Aves, FMVZ, UNAM, como testigo positivo (perteneciente al serogrupo O1). Esta última fue aislada a partir de un caso de ISV, donde se presentó elevada mortalidad, a partir de pollitos de tres días de edad de médula ósea; esta cepa pertenece al serogrupo O1 y es resistente a enrofloxacin.

**Serotipificación, Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana, Ensayo de Invasividad, Producción de Colicinas.** Las técnicas se describen en el artículo de Rosario *et al.* (2005).

**Ribotipificación.** La ribotipificación se llevó a cabo utilizando el equipo RiboPrinter® Microbial Characterization System y el equipo de preparación estándar *EcoRI* DNA (Qualicon, Inc.) de acuerdo a lo descrito por las guías de operaciones y analítica del fabricante. Brevemente, las bacterias fueron sembradas en agar sangre, e incubadas a 37.5° C durante 24 h. A partir de la zona más abundante de crecimiento en la caja de agar, con un palillo incluido en el equipo se tomó la muestra y fue suspendida en 200 µl de solución amortiguada para muestras (sample buffer®) incluido en el equipo con el objetivo de preparar una suspensión, de la cual se depositaron 30 µl en un pozo del dispositivo plástico (8 pozos) que se utiliza para procesar las muestras. Posteriormente se realizó el tratamiento térmico a 80°C durante 10 min, después de lo cual se llevó a cabo un enfriamiento rápido de la muestra. El cassette se colocó en el *RiboPrinter*®, para continuar con la fase automatizada del proceso. Este inicia con la lisis de las células; el ADN

bacteriano es digerido con *EcoRI* y los fragmentos de restricción son separados en diferentes patrones usando electroforesis en gel. El ADN de los aislamientos con los diferentes patrones es transferido a una membrana, en la cual, es hibridado con una sonda de ARNr de *E. coli* marcada con digoxigenina, la cual genera quimioluminiscencia. La emisión de luz es captada por una cámara digital como datos de imagen a partir de los que se forma el patrón del *RiboPrinter*®. El sistema de caracterización automática coloca el patrón de cada aislamiento dentro de un ribogrupo común (grupos) de acuerdo con la posición de las bandas, la similitud de la posición de las ellas, y la intensidad de los patrones en la base de datos del *RiboPrinter*®. Los ribogrupos son analizados visualmente por el procedimiento estándar del fabricante. Finalmente, con la información obtenida de los ribogrupos, se construyó un dendograma para lo cual se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, con un coeficiente de optimización de 1.56%. Los coeficientes de similitud fueron calculados con base en la posición de las bandas y la intensidad relativa de éstas.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** Se realizó la prueba de PCR utilizando los iniciadores HS61 (5'-GTA-CAG-AAC-TGC-TGG-CAA-T-3') y HS62 (5'-CAA-CAT-GAT-TCA-TCC-ATG-G-3') descritos por Houn *et al.* (1997). Para realizar esta prueba se hicieron algunas modificaciones a la técnica descrita originalmente. La mezcla para PCR consistió en 1X de la solución amortiguada de PCR, 1.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de dNTP's, 0.1 μM de cada uno de los iniciadores y 3 μl del template (una colonia bacteriana fue hervida en 25 μl de agua estéril), 0.5 unidades de ADN *Taq* polimerasa y H<sub>2</sub>O para hacer un volumen final de 50 μl. Se utilizó un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de amplificación: 94°C, 3 min.; 35 ciclos a 95°C, 30 seg.; 54°C, 30 seg.; 72°C, 1 min.; finalizando con un ciclo a 72°C, 8 min. Los productos obtenidos mediante la PCR fueron analizados por electroforesis usando un gel de agarosa al 2% en TBE (tris-borato-EDTA). Los productos amplificados por la PCR fueron considerados positivos basados en la presencia de un producto de ADN de aproximadamente 561pb teñido con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador ΦX174/*Hae* III. Finalmente, en cada corrida se incluyeron a los testigos positivos y negativo.

**Modelo de Letalidad en Embrión de Pollo.** Para realizar el ensayo en embrión de pollo, se seleccionó la cepa FM-095785. Esta cepa fue seleccionada ya que posee las características del principal grupo asociado a la ISV. Esta cepa fue aislada de saco vitelino a partir de la mortalidad del tercer día en la granja de pollo de engorda, pertenece al serotipo O2 NM, fue positiva en la hibridación de ADN a los genes *ipaH* y *cdt*, resistente a enrofloxacin, ciprofloxacina y trimetoprim y mayor 50 mg/ml de tetraciclina en la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), también fue positiva en el ensayo de PCR utilizando las sondas HS61 y HS62, y pertenece al ribogrupa más común en las cepas causantes de mortalidad, además, fue positiva en el ensayo de invasividad en la prueba *in vitro*.

Para la preparación de los inóculos bacterianos para el modelo de letalidad en embrión de pollo (41, 43), las cepas fueron sembradas en tres tubos con caldo infusión cerebro corazón (CICC) e incubadas a 37°C durante 18 h en una incubadora con agitación a 200 rpm. Cada uno de los tubos fue centrifugado a 3,000 rpm por 15 min, en una centrífuga Sorvall® RT 6000D. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida fue resuspendida en 30 ml de PBS estéril (pH 7.2), este procedimiento de lavado se repitió dos veces más bajo las mismas condiciones. El paquete bacteriano obtenido fue resuspendido en 10 ml de PBS (pH 7.2) estéril a partir de lo cual se tomó 1 ml y se resuspendió en 3 ml de PBS. La concentración bacteriana fue ajustada con un espectrofotómetro Beckman® DU640B a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ ml. A partir de este inóculo se hicieron diluciones décuples seriadas, y fueron sembrados 100 µl de las tres últimas diluciones en placas de Agar de Soya Tripticaseína (TSA) e incubadas durante 18 h a 37 °C, después de este tiempo se realizó el conteo de colonias en cada dilución y se llevó a cabo el cálculo para determinar la concentración bacteriana en cada dilución.

Para determinar la edad idónea para la inoculación de los embriones, fueron seleccionados 205 huevos fértiles comerciales, procedentes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv), de la FMVZ de la UNAM. Los huevos fueron divididos por la edad de los embriones al momento de la inoculación: 60 de 9 días, 35 de 10 días, 55 de 11 días y 55 de 12 días. La manera en como fueron

distribuidos en los diferentes grupos de inoculación se muestra en el **Cuadro 1**. Se formaron 3 grupos de acuerdo a la cepa que se inocularía, además de un grupo testigo para asegurar que los huevos se encontraban libres de contaminación bacteriana previa a la inoculación.

Los huevos fueron visualizados mediante un ovoscopio para determinar la viabilidad, situar la cámara de aire y determinar el sitio de inoculación y posteriormente inoculados vía cavidad alantoidea con una concentración de  $10^2$  UFC/100  $\mu$ l. El grupo testigo de esterilidad fue inoculado con 100  $\mu$ l de PBS estéril. Todos los grupos fueron incubados bajo condiciones comerciales (37.7 °C y 60 % de humedad). Diariamente, mediante el uso de un ovoscopio, la mortalidad embrionaria fue determinada y registrada para su evaluación posterior.

Los huevos que contenían embriones muertos fueron retirados de la incubadora; y abiertos de manera aséptica para obtener 20  $\mu$ l de líquido alantoideo, éstos fueron resuspendidos en 180  $\mu$ l de PBS estéril, y se realizaron 10 diluciones décuples seriadas. De cada una de las diluciones, fueron sembradas 3 gotas de 20  $\mu$ l cada una, en placas de agar sangre, las cuales fueron incubadas durante 24 h a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó el conteo de colonias de cada grupo y se calculó la cantidad de UFC/ ml. Una vez que la muestra de líquido alantoideo fue obtenida, los embriones fueron retirados del huevo para evaluar las lesiones producidas por los diferentes microorganismos inoculados.

**Ensayo de Crecimiento Bacteriano en Embriones de Pollo.** Se utilizaron 100 huevos fértiles comerciales de reproductoras Leghorn de 12 días, procedentes del CEIEPA de la UNAM, los cuales fueron observados mediante un ovoscopio para determinar la posición de la cámara de aire y el sitio de inoculación. Se dividieron en cuatro grupos de 25 embriones cada uno, los cuales fueron inoculados como se indica en el **Cuadro 2**.

Los muestreos se llevaron a cabo cada 3 h; el primero se realizó inmediatamente después de que fueron inoculados los embriones (hora cero), y el último 12 h post-inoculación. En total se realizaron 5 muestreos. En cada uno se seleccionaron 5 embriones de cada grupo, éstos fueron abiertos de manera aséptica y se colectaron 20  $\mu$ l cada uno de líquido alantoideo, los cuales fueron resuspendidos en 180  $\mu$ l de PBS estéril y se realizaron

diluciones décuples seriadas. De cada dilución se sembraron 3 gotas de 20  $\mu$ l en cajas de agar sangre. Las cajas fueron incubadas a 37°C por 24 h, y las colonias contadas para determinar la concentración bacteriana por ml de líquido alantoideo.

Los resultados de las cuentas bacterianas fueron sometidos a un análisis de varianza y las diferencias entre los grupos fueron determinadas por la prueba de Tukey, con el programa estadístico Statgraphics Plus para Windows 3.3.

### CAPITULO 3

### RESULTADOS

**Ribotipificación.** Se realizó la ribotipificación de 52 cepas de las 76 incluidas en el presente estudio, debido a la pérdida de muestras durante el transporte hacia el laboratorio del Southern Plains Area Agricultural Research Center, Food and Feed Safety Research Unit del United States Department of Agriculture (USDA) en la ciudad de Collage Station, Texas de los Estados Unidos de América, lugar donde se llevó a cabo la prueba. En el **Cuadro 3** se muestran los ribotipos encontrados; donde el ribogrupo más común entre las cepas analizadas fue 411-S-4, que se determinó en el 19.2%, el cual fue reconocido por el equipo por primera vez en estas cepas. Es decir, cuando se lleva a cabo la ribotipificación, con el equipo *Riboprinter* se compara el patrón del aislamiento con los que ya se encuentran almacenados en su memoria; cuando el nuevo patrón difiere de los ya reconocidos, se crea un nuevo ribotipo, por este motivo, se considera que el *Riboprinter* posee una base de datos dinámica en cuanto a los patrones de ribogrupos. Los ribogrupos 97-S-1; 104-S-4; 108-S-4 y 111-S-2 ya habían sido identificados previamente a partir de muestras procedentes de ríos y sedimentos en canales de irrigación en la frontera de México y Texas entre las poblaciones de Weslaco y El Paso, Texas; mientras el 226-S-4 fue identificado por primera vez a partir de muestras aisladas de cerdos en College Station, Texas. En el caso de los ribogrupos 293-S-7 y 295-S-8 habían sido identificados a partir de las cepas aisladas de pollitos seleccionados en la incubadora y aves con infección del saco vitelino en Bryan, Texas.

La ribotipificación produjo 17 ribotipos, distribuidos en cuatro grupos principales. En el primero se encontraron tres cepas, dos de ellas aisladas en incubadora y una a partir de pollo de engorda. Estas pertenecían a serotipos diversos; todas produjeron Col V y dos, otras colicinas.

En el segundo grupo se encontraron seis cepas; todas ellas aisladas a partir del quinto día de vida del pollito, el cual fue junto con el día tres, donde se observaron los porcentajes más altos de mortalidad y aislamiento de *E. coli*. Cuatro de ellas pertenecían al serogrupo O78 y cinco poseían el antígeno flagelar H9. Este grupo mostró un patrón de



resistencia muy homogéneo, ya que todas eran resistentes a ampicilina, enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfa/trimetoprim, kanamicina y tetraciclina; tres resistentes a piperacilina y una a gentamicina. En el caso de la producción de colicinas se observó que tres produjeron Col V y una, colicinas diferentes a la V, mientras que las tres restantes eran no colicinogénicas.

El tercer grupo fue el más diverso pues en él se encontraron 29 cepas, aisladas de reproductoras (n=2), incubadora a los 19 días (n=9), pollo de engorda a los cinco (n=8), seis (n=5) y siete días (n=5). Dentro de este grupo se encontró un grupo pequeño denominado 3a (**Figura 1**) donde se ubicaron las dos cepas aisladas de reproductoras junto con aislamientos de huevo infértil a los 19 días de incubadora. En el hubo una gran diversidad tanto del antígeno somático como del flagelar; además de una amplia gama de patrones de resistencia para los antimicrobianos evaluados y la producción de colicinas.

El cuarto grupo fue uno de los más homogéneos, en éste se ubicaron 14 cepas aisladas a partir de incubadora a los 21 días (n=3), pollo de engorda al día tres (n=7), cuatro (n=1), cinco (n=2) y seis (n=1). El serotipo predominante fue el O2:NM con 11 cepas. Diez cepas presentaron resistencia hacia enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfa/trimetoprim y tetraciclina, aunque se determinó la presencia de otros patrones de resistencia. La producción de colicinas fue muy similar entre los aislamientos, donde once cepas eran productoras de Col V y el mismo número produjeron otras colicinas diferentes a Col V, mientras que solamente dos cepas fueron no colicinogénicas.

**PCR.** Únicamente ocho cepas produjeron una banda de 561 pb del producto de amplificación de IS630. En el caso de las cepas positivas, todas ellas pertenecieron al serotipo O2 NM y habían sido positivas en la prueba de hibridación del ADN para el gen *ipaH* (**Cuadro 4 y Figura 2**). A excepción de una de ellas, todas fueron positivas a *cdt* en la misma prueba. Adicionalmente, todas fueron aisladas en pollo de engorda a partir de la mortalidad del día tres de vida del pollito, donde se presentó la cantidad más alta de cepas positivas a *ipaH* en la prueba de hibridación. Seis de las cepas positivas fueron aisladas de diferentes aves y las dos restantes fueron del mismo pollo pero de diferentes órganos (hígado y saco vitelino). Las cepas positivas en la prueba de PCR se encontraron dentro del cuarto grupo del esquema de ribotipificación.

**Modelo de letalidad en embrión de pollo.** El Cuadro 5 muestra los resultados de la mortalidad embrionaria tras la inoculación de tres cepas de *E. coli* a diferentes edades de incubación. Se observó una menor mortalidad en todas las edades de inoculación para la cepa K-12. A los 9 días esta cepa provocó una mortalidad elevada (65%), pero inferior a las cepas CR-000089 (100%) y FM-095785 (96%). En los embriones inoculados el día 10, también se presentó una mortalidad alta en los inoculados con K-12 (80%) aunque, nuevamente, inferior a la causada por las cepas CR-000089 y FM-095785. Para el día 11 ya hubo una mayor diferencia entre la cepa K-12 y la CR-000089 y FM-095785. El día 12 se encontró un contraste más claro en la mortalidad causada por las tres cepas; ya que el grupo K-12 produjo una mortalidad del 20% la cual fue similar a la apreciada en los embriones inoculados con PBS estéril, mientras en los grupos de CR-000089 y FM-095785 la mortalidad fue de 80 y 86.6% respectivamente. La Figura 3 muestra los porcentajes de mortalidad en todos los días de inoculación, en ella la mortalidad provocada por la cepa O1 y 095785 es siempre más alta que la que se encuentra en la cepa K-12; y ésta, a su vez, es más alta (a excepción del día 12) que los embriones inoculados con PBS estéril.

Las lesiones macroscópicas encontradas en los embriones consistieron en hemorragias y congestión generalizada; las cuales fueron más evidentes en las venas de extremidades, parte posterior de la cabeza y yugular (Figura 5). Sin embargo, no fue posible determinar diferencias entre los embriones inoculados con las tres cepas. En el examen *post mortem*, los embriones estaban friables y la inspección de los órganos internos fue difícil, aunque en algunas ocasiones estaban igualmente hemorrágicos y congestionados. Adicionalmente, algunos embriones inoculados eran de menor tamaño cuando se hacía la comparación con embriones no inoculados de la misma edad.

**Ensayo de crecimiento bacteriano en embrión de pollo.** Los resultados del ensayo de crecimiento bacteriano en embrión de pollo se muestran en el Cuadro 6. En los embriones inoculados con PBS estéril no hubo crecimiento durante todo el período de prueba. En el caso de las tres cepas se realizaron diluciones décuples seriadas para establecer la concentración bacteriana de los inóculos originales y se determinó que estos contenían 1.6 UFC/ 200 uL  $\log_{10}$  para K-12 y CR-000089, 1.8 UFC/ 200 uL  $\log_{10}$  para la cepa FM-095785. Desde las 3 h se detectó un crecimiento constante de las tres cepas, sin

embargo, siempre se presentó un menor crecimiento en la cepa de K-12, seguido de la CR-000089 y por último, la FM-095785 con el mayor crecimiento. A las 12 h, en el grupo testigo de esterilidad no hubo crecimiento bacteriano; el grupo K-12 alcanzó 6.9 UFC/mL  $\log_{10}$ , mientras CR-000089 y FM-095785 tuvieron un crecimiento de 8.3 y 8.6 UFC/mL  $\log_{10}$ , respectivamente. Al realizar el análisis estadístico se encontró, tanto a las 9 como a las 12 horas post-inoculación, una diferencia estadística altamente significativa ( $P < 0.0001$ ), entre el testigo de esterilidad y el grupo de K-12, y de éste con respecto a CR-000089 y FM-095785, sin embargo, no hubo diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre los dos últimos (**Figura 4**).

## CAPITULO 4

### DISCUSIÓN

Las infecciones bacterianas, causadas por *E. coli*, tienen una gran importancia en las aves de producción alrededor del mundo; algunos autores estiman que su costo supera los cien millones de dólares anualmente (7, 8, 11, 14, 16). Sin embargo, en algunas ocasiones se subestima el papel de este microorganismo pues se consideran parte de las infecciones secundarias normales presentes en las aves.

Actualmente la clasificación de las cepas aviarias reúne a todas las cepas patógenas para aves dentro del grupo APEC; lo cual ha dado como resultado la constitución de un grupo sumamente heterogéneo, pues los factores de virulencia identificados en estas cepas no son comunes a todas ellas; por lo tanto, no se cuenta con bases para determinar la inclusión de un aislamiento dentro del grupo APEC. Recientemente, Rodríguez-Siek *et al.* (2005) sustenta este planteamiento al mencionar: “si *E. coli* es capaz de producir enfermedades en aves mediante el uso de un conjunto único de factores de virulencia, estas bacterias constituirían un grupo específico de cepas comúnmente conocido como patotipo. Al tomar en cuenta las distintas manifestaciones en aves, incluidas colisepticemia, peritonitis celulitis, salpingitis, sinovitis, onfalitis, aerosaculitis y coligranuloma es razonable la existencia de múltiples patotipos de *E. coli* asociadas a infecciones aviarias”.

A pesar del amplio conocimiento de las cepas APEC generado en otros países, los datos sobre la importancia de las cepas de *E. coli* causantes de ISV es prácticamente nulo, al clasificarlas de baja o nula patogenicidad (15, 22, 23, 49); más aún, se considera a la mortalidad causada por ellas, parte de las pérdidas normales durante las dos primeras semanas de vida del pollito.

En México, en un estudio previo, se estableció que *E. coli* fue la principal causa de ISV en una empresa integrada (32), además, los datos obtenidos sugerían que la principal fuente de contaminación del huevo fértil no era la granja de reproductoras, como se había señalado por largo tiempo. Adicionalmente se logró identificar algunos genes de virulencia descritos para los grupos diarreogénicos de humanos, como son *ipaH* (de las cepas EIEC), *eae* (de los grupos EPEC y EHEC) y *cdt* (principalmente detectado en el grupo EPEC), los cuales no habían sido referidos previamente en cepas aviarias (34). Estos resultados apuntan

hacia la posibilidad de que estos genes se encuentren involucrados en el proceso patológico observado, es decir, que sean cepas patógenas contrariamente a lo que se creía anteriormente (34).

En el presente trabajo se realizó la caracterización del grupo de cepas positivas al gen *ipaH*. Dicho gen ha sido descrito en las cepas de *Shigella* spp. y EIEC, las cuales están relacionadas de manera muy cercana (1, 2, 4, 50, 51, 52, 53, 54), e incluso se ha considerado incluirlas en la misma especie (51). Una de las características predominantes de estas cepas es la capacidad de invadir las células epiteliales del intestino (1). La invasión se define como la transferencia de un agente de una célula a otra del mismo tejido; o el paso a través de una barrera como una membrana para infectar a otro tejido. Durante largo tiempo, se han diseñado diferentes ensayos para demostrar la capacidad invasiva de una bacteria. Uno de los primeros intentos fue la prueba de Sereny la cual tiene como fundamento la invasión de la conjuntiva de cobayo (55, 56). Sin embargo, a partir de los años setentas se ha puesto mucho énfasis en el desarrollo de pruebas en cultivos celulares, ya que estos representan un sistema experimental uniforme en el que se pueden estudiar con condiciones definidas los complejos fenómenos biológicos tales como la invasividad (57).

Uno de los primeros reportes sobre los ensayos de invasividad subraya la necesidad de un antígeno somático liso en las bacterias para la presentación del fenómeno de invasividad (58); estudios posteriores, demuestran que los oligosacáridos de las cepas lisas y rugosas del lipopolisacárido en *Shigella* spp. no afectan la habilidad de una cepa invasiva para penetrar los cultivos celulares (59). Nuestros resultados fueron similares a los observados por Okamura (59) pues a pesar de que algunas de las cepas evaluadas (n =11) eran rugosas, fueron positivas al ensayo de invasividad (cepas clasificadas como OR).

En las preparaciones de los ensayos de invasividad, las cepas *ipaH*<sup>+</sup> produjeron cambios en la morfología celular de los cultivos, modificaciones de la afinidad tintorial y disrupción de la membrana celular. En algunos casos se presentó el desprendimiento total de la monocapa durante la fase de infección, lo cual puede ser atribuido a la producción de citotoxinas (60).

En más del 30% de las preparaciones celulares se observó la formación de proyecciones del citoplasma. Estas pueden ser inducidas por cepas de *Shigella* spp. y EIEC

(61, 62, 63, 64, 65) durante la invasión a las células epiteliales. Una vez que la bacteria ha penetrado en la célula, lisa rápidamente la membrana del fagosoma y se multiplica libremente dentro del citosol; durante esta etapa la bacteria se mueve intracelularmente lo que provoca la formación de protrusiones celulares que impulsan a la bacteria dentro de las células adyacentes (60, 61, 62, 63, 66, 65).

Las cepas estudiadas portadoras del gen *ipaH* y positivas en el ensayo de invasividad, no poseían las características bioquímicas y serológicas descritas para el grupo EIEC. Generalmente, se considera a las cepas EIEC como lisina descarboxilasa negativas, lactosa negativas y no móviles (1, 2, 50, 53, 55). Sin embargo, algunos autores han reportado la existencia de cepas EIEC que no poseen las características previamente descritas (50, 53, 55, 67, 68).

Los serotipos O28ac, O29, O42, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O164 y O167 son considerados como clásicos de las cepas EIEC (1, 4, 52, 53, 55, 68, 69). A pesar de ello, las cepas *ipaH*<sup>+</sup> aisladas a partir de muestras de aves no pertenecen en su mayoría a dichos serogrupos, y solo se encontraron dos cepas que pertenecían a estos grupos, mientras que el 96% pertenecían a otros serotipos; entre los más comunes O2 (n=20), OR (n=11) y O? (n=10). Particularmente O2 y OR han sido descritos junto con O1 y O78 como los serogrupos que se encuentran de manera más común entre las cepas APEC (16, 17, 23, 70, 71, 72, 73, 74). Por otra parte, Barnes *et al.* (2003) menciona que la mayoría de los serotipos aislados a partir de aves solo son patógenos de ellas, no obstante, algunas cepas O2 han sido relacionadas con infecciones urinarias y meningitis en humanos. Lo anterior ha llevado a establecer que la relación clonal entre las cepas no esta forzosamente ligada al hecho de pertenecer a un mismo serotipo (75, 76).

Por otro lado, se realizó la prueba de PCR utilizando los iniciadores HS61 y HS62 para confirmar la pertenencia de estos aislamientos al grupo EIEC. Los resultados obtenidos mostraron solo ocho cepas positivas, a pesar de que todas las cepas habían sido positivas cuando se realizó la hibridación de ADN utilizando una sonda del gen *ipaH*. Posiblemente, los resultados se relacionen a la variabilidad en la presencia de IS630 entre las cepas de *Shigella* y EIEC, a diferencia de *ipaH*. Kong *et al.* (2002) realizaron una PCR multiplex, utilizando al gen *virA*, para detectar a las cepas invasivas, sin embargo, solo

encontraron 50% de aislamientos positivos, por esta razón ellos eligieron utilizar los iniciadores de *ipaH* por ser más confiables que los de *virA* para la detección de *Shigella* spp. En el presente estudio un hecho similar fue detectado en el caso de los iniciadores de IS630, pues durante la estandarización de la prueba se analizaron varias especies de *Shigella*, y únicamente *S. sonnei* y una cepas EIEC dieron un resultado positivo. Como ya se mencionó, a pesar de obtener solamente siete aislamientos positivas al utilizar estos iniciadores, en los ensayos de invasividad *in vitro* todas las cepas produjeron los efectos característicos ya descritos para las cepas EIEC.

Tradicionalmente, se considera a los humanos y otros primates subhumanos como los hospederos naturales de las cepas EIEC (67, 78). Por este motivo, resulta interesante que las cepas *ipaH*<sup>+</sup> analizadas hayan sido aisladas a partir de muestras procedentes de aves, específicamente de aves con infección del saco vitelino, es decir, cepas extraintestinales y no de casos de diarrea en donde se aísla comúnmente a las cepas EIEC. Este hecho junto con las diferencias encontradas en las reacciones bioquímicas, serológicas y PCR sugieren que estas cepas pertenecen a clonas invasivas extraintestinales de *Escherichia coli* (ExIEC), capaces de provocar una condición patológica en las aves.

Algunas de las características descritas para el grupo APEC fueron evaluadas en las cepas ExIEC. La producción de colicinas es una de las reportadas con mayor frecuencia entre las cepas APEC, sin embargo, un estudio realizado por Faundez *et al.* (1988), mostró la ausencia de colicinogenia en un grupo de cepas EIEC. En el presente estudio se encontró que 66% de las cepas ExIEC fueron productoras de al menos un tipo de colicinas, mientras 48.7% produjo Col V. Ésta es un polipéptido de 88 aminoácidos (80) y una de las colicinas más comunes entre las 20 conocidas actualmente (81); además, se ha encontrado básicamente entre las cepas patógenas extraintestinales tanto de animales como de humanos (69, 81, 82). El porcentaje de producción de Col V en el presente estudio es menor al observado en otros estudios donde entre el 72% y 87% de las cepas son colicinogénicas (16, 19, 26, 81). Sin embargo, nuestros resultados coinciden con otro estudio realizado en México con cepas septicémicas (83). Estos datos pueden ser un indicio de una menor distribución del plásmido de Col V entre las cepas mexicanas, al compararla a la encontrada en otras regiones geográficas.

En los años recientes, una de las características más estudiadas es la resistencia a antibióticos en las cepas aisladas de los animales de abasto. En las aves, desde 1950, una de las principales medidas para controlar los problemas ocasionados por *E. coli*, es el uso algunos antimicrobianos, tanto de manera profiláctica como terapéutica. Esta práctica tan ampliamente difundida, ha ejercido una presión selectiva sobre las bacterias; en consecuencia, se ha incrementado la incidencia en el aislamiento de cepas resistentes a múltiples agentes antimicrobianos (25, 84, 85, 86, 87). El interés a escala internacional sobre el incremento en el aislamiento de cepas resistentes a antibióticos a partir de las aves o productos avícolas ha crecido considerablemente (84, 86), pues representan una fuente potencial de genes de virulencia que pueden transmitirse a la biota intestinal del humano (7, 76, 88).

En el presente estudio (90) se encontró una elevada resistencia a diversos antibióticos, como en el caso de la ampicilina (64.5%). Bass *et al.* (25), sugieren que esta resistencia puede ser un reflejo de la observada hacia ceftiofur, cefalosporina de amplio espectro resistente a las beta-lactamasas, usada comúnmente en la industria avícola junto con la vacuna de Marek. Esta teoría explicaría los resultados obtenidos en este estudio, donde se observó una baja sensibilidad hacia algunas cefalosporinas no empleadas en la avicultura.

Actualmente, se observa de manera rutinaria el aislamiento de microorganismos resistentes a dos o más antibióticos entre las cepas bacterianas de humanos (25) y animales (89). Este fenómeno se debe al surgimiento de rutas eficientes de adquisición y diseminación, tanto horizontal como vertical, de elementos móviles como plásmidos, transposones y cassettes de genes en integrones (91). Un hallazgo sobresaliente del presente estudio (90) es la alta incidencia de cepas multirresistentes. Únicamente se lograron aislar ocho cepas sensibles a todos los antibióticos probados, y solo dos fueron resistentes a un solo antibiótico. Mientras el 87% de las cepas estudiadas fue resistente a dos o más compuestos. La alta incidencia de cepas multirresistentes aisladas a partir de animales de abasto ha sido ampliamente documentada por diversos autores (25, 76, 92, 93)

Recientemente, se ha discutido la relación de la resistencia a antibióticos y la virulencia (94). Ambos se han definido como mecanismos adaptativos adquiridos para



incrementar la sobrevivencia de los microorganismos bajo condiciones estresantes (95); por esta razón, la amplia distribución de la resistencia entre las poblaciones bacterianas, puede ser un mecanismo mediante el cual se mantiene, e incluso aumenta el número de gérmenes patógenos involucrados en infecciones.

La ribotipificación ha sido considerada, junto con otras técnicas moleculares, una promesa para discriminar entre un gran número de bacterias, tales como bacterias fecales de humanos y de animales (96), pues otros métodos tradicionalmente usados como los perfiles de resistencia a antibióticos son muy inestables, tanto genéticamente, como por cambios en el uso de antibióticos (47, 96). La ribotipificación ha sido utilizada para caracterizar genéticamente a algunos de los principales patógenos de los humanos, tales como *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes* (97). En el presente estudio, la ribotipificación permitió diferenciar básicamente cuatro grupos de aislamientos relacionados a un problema de infección del saco vitelino. Uno de los grupos más representativos fue el cuarto donde se encontraban las cepas aisladas durante los días de mayor mortalidad.

Aunque también ha sido utilizada para estudios epidemiológicos de infecciones causadas por *E. coli* (48, 98, 99), algunos autores mencionan que la serotipificación sigue siendo el método de referencia para la caracterización de *E. coli* y otros organismos relacionados, tales como *Shigella* (48).

El interés por los ribotipos para determinar la clonalidad de las bacterias utilizando ARNr (45) ha crecido enormemente. Sin embargo, algunos autores reportan que la ribotipificación no debe ser utilizada como única herramienta para la identificación de las cepas patógenas de *E. coli* debido a la imposibilidad de diferenciar cepas pertenecientes al mismo serotipo (97, 100). Los datos obtenidos en el presente estudio muestran cepas pertenecientes al mismo serotipo pero ubicadas mediante la ribotipificación en diferentes grupos, es decir, no podían ser clasificadas como cepas con un mismo origen, por lo tanto se confirma la necesidad de recurrir a diferentes técnicas para conocer la clonalidad de microorganismos involucrados en procesos patológicos. Particularmente, en este caso, la información obtenida es de gran ayuda para orientar al clínico a establecer la fuente de contaminación de las aves que sufren ISV, y en consecuencia, dirigir de una manera más

certera las medidas correctivas. El hecho de que en el grupo 3a se localizaron las cepas de reproductoras e incubadora a los 19 días, sugiere que las cepas de reproductoras no están relacionadas con las causantes de problemas en pollo de engorda, pues estas se localizaron básicamente en los grupos 2 y 4; ya que en este último se ubicaron las cepas aisladas el día de mayor mortalidad. Por esta razón es conveniente encaminar el control de la ISV a nivel de la incubadora después de que se realiza la transferencia del huevo a la hacedora. No obstante, en el caso de algunos microorganismos la ribotipificación ha confirmado los datos obtenidos por métodos más sencillos; Andollina *et al.* (2004) en su estudio sobre *Staphylococcus* spp., reportaron que todas las cepas fueron ribotipificadas y agrupadas exitosamente en algún grupo, además de que la identificación correspondía a la que se obtuvo mediante pruebas bioquímicas; a diferencia de lo observado en el presente trabajo, donde hubo una gran heterogeneidad dentro de los grupos con respecto a los serotipos y resistencias a antimicrobianos; a excepción del cuarto grupo donde se puede observar que hay predomina el serotipo O2:NM y la resistencia a enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfa/trimetoprim y tetraciclina.

Una de las desventajas de esta técnica es el elevado costo. Se calcula que únicamente por concepto de los consumibles el costo asciende a 40 dólares (USD) por cada cepa; sin embargo, Andollina *et al.* (2004), predicen una disminución paulatina en el precio de la ribotipificación automática, dependiendo del número de cepas probadas. Esta tendencia dará como resultado una técnica más barata al compararla con el mismo procedimiento hecho de forma manual. Aunado a este problema económico, algunos autores mencionan como otra desventaja de la ribotipificación, la dificultad en el procedimiento e interpretación de los resultados, por ello sugieren el uso de otras técnicas más sencillas y con la misma capacidad para discriminar aislamientos como pruebas bioquímicas o la prueba de electroforesis en gel con campos pulsados (101).

Durante el análisis de las cepas no se requirió del uso de otra enzima de restricción para lograr la identificación plena e inclusión dentro de algún ribogrupo. Sin embargo, es sabido que la elección de las enzimas de restricción utilizadas en esta técnica es crítica para poder realizar una diferenciación entre las bandas producidas, pues algunas cepas pueden presentar un fragmento del mismo tamaño con diferentes orígenes (102). Nuevamente, no

se puede establecer un parámetro general para todos los microorganismos, e incluso existen divergencias entre diferentes autores, pues mientras Andollina *et al.* (2004) consideran a *EcoRI* una buena elección para la discriminación de diferentes genotipos, debido a que produce más bandas y ribotipos que *Hind III*; Machado *et al.* (1998), menciona que la mejor endonucleasa es *MuI* pues genera resultados más satisfactorios en la identificación de los serotipos de *E. coli* mediante ribotipificación.

El control de la colibacilosis se ha dificultado por la falta de una prueba diagnóstica para determinar la patogenicidad de los aislamientos (41). Recientemente se ha propuesto utilizar la inoculación de embriones para establecer la virulencia de los aislamientos aviares de *E. coli*, por ser una prueba sencilla y poco costosa (41, 103), además de correlacionar con los resultados obtenidos en los desafíos de aves por vía intravenosa y subcutánea (43).

Una vez determinada la identidad de las bacterias ExIEC, así como algunas características fenotípicas y la relación clonal de ellas; fue seleccionado un aislamiento con las características predominantes del grupo cuatro y se empleó para realizar los ensayos de letalidad en embriones de pollo.

Gross (1994), reportó mortalidad embrionaria tras la inoculación con una cepa virulenta serotipo O1 a dosis de 10 bacterias. Por su parte Wooley *et al.* (2000) utilizaron en su ensayo de letalidad embrionaria entre 100 y 300 UFC para la inoculación, y lograron determinar la patogenicidad de diferentes aislamientos. Sin embargo, Gibbs *et al.* (2003-2) afirman que no existe relación entre el número de embriones muertos y las UFC administradas a los embriones de pollo. En nuestro trabajo se utilizaron 100 UFC/100  $\mu$ l, y se observaron diferencias entre los grupos inoculados a partir de los once días. Lo que contrasta con Dias da Silveira, *et al.* (2002) al reportar dosis letales<sub>50</sub> superiores a  $10^{10}$  células/ml en *E. coli* aislada de casos de onfalitis o de la flora normal en pollitos de un día de edad por vía subcutánea; y atribuyen sus hallazgos a la baja virulencia de los aislamientos. Estos resultados sugieren que las cepas ExIEC son cepas virulentas, pues en el presente estudio *E. coli* a dosis de  $10^2$  UFC fue capaz de matar al 80% de los embriones inoculados.

En el experimento donde se inocularon embriones de varias edades por vía cavidad

alantoidea se presentó una mortalidad similar en los embriones inoculados con las tres cepas a los 9 y 10 días, sin embargo a partir de los 11 días es más notoria la diferencia entre las cepas patógenas y la cepa K-12. La ISV puede provocar mortalidad embrionaria desde la incubadora; después del nacimiento, el pico de mortalidad se alcanza entre los días tres y cinco. Posiblemente la mortalidad encontrada en los embriones menores de once días explique los hallazgos en el campo; es decir, cuando la infección ocurre durante la incubación antes del día once, la muerte de los pollitos puede presentarse antes del nacimiento e incrementar el número de embriones muertos en el cascarón, como se denomina a los embriones débiles capaces de abrir la ventana en el cascarón y mueren antes de eclosionar. Por el contrario, si el crecimiento bacteriano es lento por ser una cepa de baja virulencia o bien, la contaminación ocurre después del día once, el pollito nacerá débil, pero la muerte se presentará algunos días después.

Adicionalmente, las lesiones observadas por Wooley *et al.* (2000), al inocular cepas virulentas y medianamente virulentas, coinciden con las encontradas en el presente estudio, es decir, hemorragias en la piel y cráneo de los embriones. De igual forma, estos autores encontraron mayor número de embriones muertos durante el segundo día post-inoculación en el caso de las cepas más virulentas (18, 41), resultados semejantes a los vistos en el presente estudio en embriones inoculados a los once y doce días de incubación. Estos autores recomiendan hacer el análisis hasta los cuatro días post-inoculación para reducir la variabilidad y tener una mayor confiabilidad; además subrayan la importancia de tomar en cuenta el porcentaje y fecha de mortalidad para determinar la virulencia de una cepa.

En algunos estudios se ha relacionado la presencia de algunos factores de virulencia con una alta mortalidad en el ensayo de letalidad embrionaria (17), particularmente con la producción de colicinas. Esto hallazgos pueden estar relacionado a la presencia de otros factores de virulencia en plásmido de Col V (pColV) (9, 18, 69, 81, 95), lo que explicaría en cierta medida la mortalidad provocada al inocular la cepa FM-095785, la cual fue productora de Col V y otras colicinas. Otros estudios también mencionan la existencia de una fuerte relación entre la virulencia y la presencia de *iss* o *tsh*; no obstante, ninguna de estas características han correlacionado al 100% con la virulencia (18).

En el ensayo de crecimiento bacteriano, se determinó el crecimiento de las tres

diferentes cepas en los embriones de pollo durante un período de 12 horas. Se pudo determinar que los embriones comerciales no estaban contaminados antes de la inoculación pues ningún embrión mostró crecimiento bacteriano durante toda la prueba. Aunque se requieren estudios más profundos, estos datos sugieren el uso de embriones comerciales como una opción, siempre y cuando se incluya un grupo testigo de esterilidad de los embriones. Principalmente, cuando exista la limitante de contar con embriones libres de patógenos específicos para la realización de los ensayos de letalidad embrionaria de *E. coli*.

Por otro lado, se estableció un mayor crecimiento de casi dos logaritmos en las cepas patógenas al compararlas con el testigo negativo (K-12) (**Cuadro 6 y Figura 4**). Estos hallazgos podrían estar relacionados con la capacidad de sobrevivir, multiplicarse y por consiguiente incrementar la mortalidad provocada por las cepas CR-000089 y FM-095785 en los embriones. El huevo posee mecanismos para evitar la contaminación bacteriana como la cutícula, cascarón, membranas del huevo, así como la ovotranferrina presente en la albúmina; considerada el principal mecanismo de defensa contra el crecimiento bacteriano, ya que captura el hierro y evita que las bacterias lo utilicen (104). Aunque en el presente estudio no se determinó la presencia de elementos de captura de hierro en los aislamientos, se sabe que pColV también codifica para el sistema de captación de hierro aerobactina (16, 69), por este motivo, la producción de Col V podría ser un indicativo de la presencia este tipo de mecanismos secuestrantes. Inclusive, en cepas patógenas de *E. coli* se ha detectado la presencia de múltiples sistemas de captación de hierro, lo que subraya la importancia de este elemento en la patogénesis de la colibacilosis (16, 30).

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

El presente estudio define las características de un grupo virulento de cepas de *E. coli* asociadas a la ISV y sugiere fuertemente la existencia de un número limitado de clones que poseen ciertos factores que les confieren la capacidad de provocar enfermedad en aves. Además, debido a que la mayoría de estos aislamientos no pertenecen a los serotipos reportados previamente como clásicos de las cepas EIEC, el presente estudio ofrece la oportunidad de estudiar el papel que desempeñan clones especialmente adaptados de cepas invasivas extraintestinales de *E. coli* (ExIEC) en las infecciones que se presentan en aves. En nuestro conocimiento, este es el primero trabajo que demuestra la existencia de cepas ExIEC relacionadas a las cepas EIEC en un hospedero diferente a los primates, incluidos los humanos. Esta información puede ser de utilidad en el entendimiento de la patogénesis de las infecciones por ExIEC.

#### **Perspectivas**

Al ser este el primer trabajo donde se reportan cepas ExIEC en aves, aun deben realizarse otros estudios más amplios. Uno de los puntos importantes es que estas cepas fueron aisladas a partir de una empresa, sin embargo, sería importante la realización de una investigación más extensa para conocer la prevalencia de estas cepas en México y determinar su papel en las colibacilosis de las aves.

Por otra parte, dentro del estudio de crecimiento bacteriano, se encuentra en proceso el análisis de las lesiones microscópicas provocadas por estas cepas en los embriones de pollo.

De igual manera, sería conveniente poder determinar el tipo de colicinas producidas por las cepas de este estudio para complementar los datos con los que se cuentan hasta el momento y determinar si en verdad estas colicinas participan en la patogénesis de la ISV.

Finalmente, en algunas de estas cepas se detectaron previamente otros dos genes como son *eae* y *cdt*, por lo que se requiere analizar cual es el papel de ellos, así como determinar una posible interacción con los mecanismos de invasividad en la presentación de la enfermedad clínica en las aves.

## CAPITULO 6

### REFERENCIAS

1. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol ; 11: 142-201.
2. Salyers AA, Whitt DD. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains. In: Bacterial pathogenesis a molecular approach. 2<sup>nd</sup> ed. American Society of Microbiology. Washington, 2002. 407-421.
3. Scott DA, Kaper JB. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. Infect Immun 1994; 62: 244–251.
4. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigen, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis 1987; 155: 377-389.
5. Clermont O, Cordevant C, Bonacorsi S, Marecat A, Lange M, Bingen E. Automated Ribotyping Provides Rapid Phylogenetic Subgroup Affiliation of Clinical Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains. J Clin Microbiol 2001; 12: 4549–4553.
6. 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.
7. Barnes JH, Vaillancourt JP, Gross WB. Colibacillosis. In: Saif YM. Diseases of Poultry, 11<sup>th</sup> ed., Iowa State Press, Iowa. 2003: 631-656.
8. Rosenberger JK, Fries PA, Cloud SS, Wilson RA. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. Avian Dis; 29: 1094-1107.
9. 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.
10. Fantanatti F, Dias da. Silveira W, Castro AFP. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. Vet Microbiol 1994; 41: 75–86.

11. Gibbs PS, Wooley RE. Comparison of the intravenous chicken challenge method with the embryo lethality assay for studies in avian colibacillosis. *Avian Dis* 2003-1; 47: 672-680.
12. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* 1999; 30: 299-316.
13. Delicado ER, Guimaraes de Brito B, Gaziri LCJ, Vidotto MC. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol* 2003; 94: 97-103.
14. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Jansen WH, García V, Vázquez ML, Blanco J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet Microbiol* 1998; 61: 229-235.
15. Dias da Silveira W, Ferreira A, Brocchi M, de Hollanda LM, Pestana de Castro A F, Tatsumi YA, Lancellotti M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* 2002-1; 85: 47-53.
16. 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.
17. Ginns, CA, Benham ML, Adams LM, Whithear 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.
18. 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* 2003-2; 47: 370-379.
19. 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.
20. Peighambari SM, Vaillancourt JP, Wilson RA, Gyles CL. Characteristics of



- Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. Avian Dis 1994; 39: 116-124.
21. 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.
  22. Dias da Silveira W, Ferreira A, Lancellotti M, Barbosa IGCD, Leite DS, de Castro AFP, Brocchi M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. Vet Microbiol 2002-2; 89: 323-328.
  23. Gross WG. Diseases due to *Escherichia coli* in Poultry. In: Gyles CL. *Escherichia coli* in domestic animals and human, Cab International ed., Wallingford. 1994: 237-259.
  24. Mosqueda TA, Lucio MB. Enfermedades comunes de las aves domésticas. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 1985: 377-381.
  25. Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG, Maurer JJ. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2925-2929.
  26. Pinto da Rocha ACG, Bernardes da Silva A, Guimaraes de Brito B, De Souza Moraes HL, Pontes Pontes A, Cé MC, Pinheiro do Nascimento V, Pippi Salle CT. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the South of Brazil. Avian Dis 2002; 46:749-753.
  27. Bains BS. A Manual of poultry diseases. Editiones "Roche", Switzerland. 1979: 105-106.
  28. Coutts GS. Poultry diseases under modern management. 2<sup>nd</sup> ed. Saiga Publishing Co. LTD, London. 1981: 36-41.
  29. Gordon RF, Jordan FTW. Enfermedades de las aves. 2<sup>nd</sup> ed. El Manual Moderno ed., México. 1985: 54-56.
  30. Rodriguez-Siek K, Giddings CW, Doetkott C, Jonson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. Vet Res 2005; 36: 241-256.
  31. Gross WB. Retained Caseous Yolk Sacs Caused by *Escherichia coli*. Avian Dis 1964; 8: 438-441.

32. Rosario CC, Téllez IG, López CC, Villaseca FJ, Anderson RC, Eslava CC. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs and neonatal broilers with yolk sac infection. *Rev Latinoam Microbiol* 2004-1; 46: 12-16.
33. Harry EG. The effect on embryonic and chick mortality of yolk contamination with bacteria from hen. *Vet Rec* 1957; 69: 1433-1439.
34. 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 chicken with yolk sac infection. *Avian Dis* 2004; 48: 791-802.
35. Houg HSH, Sethabutr O, Echeverria P. A simple polymerase chain reaction technique to detect and differentiate *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in human feces. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28:19-25.
36. Wong RSY, Chow AW. Identification of enteric pathogens by heat shock protein 60 kDa (HSP60) gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 206: 107-113.
37. Thiem VD, Sethabutr O, von Seidlein L, Tung TV, Canh DG, Chien BT, Tho L H, Lee H, Houg HS, Hale TL, Clemens JD, Mason C, Trach DD. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the ipaH gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2031–2035.
38. Sansonetti PJ. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol Rev* 2001; 25:3-14.
39. Venkatesan MM, Alexander WA, Fernandez-Prada C. A *Shigella flexneri* invasion plasmid gene, *ipgH*, with homology to IS629 and sequences encoding bacterial sugar phosphate transport proteins. *Gene* 1996; 175: 23-27.
40. Houg HSH, Venkatesan MM. Genetic analysis of *Shigella sonnei* form I antigen: identification of a novel *IS630* as an essential element for the form I antigen expression. *Microb Pathog* 1998; 25:165-173.
41. 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.

42. Chaffer M, Heller ED, Schwartsburd B. Relationship between resistance to complement, virulence and outer membrane protein patterns in pathogenic *Escherichia coli* O2 isolates. *Vet Microbiol* 1999; 64: 323-332.
43. Gibbs PS, Petermann ASR, Wooley RE. Comparison of Several Challenge Models for Studies in Avian Colibacillosis. *Avian Dis* 2004; 48:751-758.
44. Montgomery RD, Jones LS, Boyle CR, Luo Y, Boyle JA. The Embryo Lethality of *Escherichia coli* Isolates and Its Relationship to Various In Vitro Attributes. *Avian Dis* 2005; 49:63-69.
45. Machado J, Grimont F, Grimont PAD. Computer identification of *Escherichia coli* rRNA gene restriction patterns. *Res Microbiol* 1998; 149: 119-135.
46. Scott TM, Parveen S, Portier KM, Rose JB, Tamplin ML, Farrah SR, Koo A, Lukasik J. Geographical Variation in Ribotype Profiles of *Escherichia coli* Isolates from Humans, Swine, Poultry, Beef, and Dairy Cattle in Florida. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 1089-1092.
47. Andollina A, De Cesare A, Bertoni G, Modelli L, Manfreda G. Identification and genetic characterisation of orthopaedic *Staphylococcus* isolates collected in Italy by automated *EcoRI* ribotyping. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234:275-280.
48. Coimbra RS, Nicastro G, Grimont PAD, Grimont F. Computer identification of *Shigella* species by rRNA gene restriction patterns. *Res Microbiol* 2001; 152 47-55.
49. Zhao S, Maurer JJ, Hubert S, De Villena JF, McDermott PF, Meng J, Ayers S, English L, White DG. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Vet Microbiol* 2005; 107: 215-224.
50. Martinez MB, Whittan TS, McGraw EA, Rodrigues J, Trabulsi LR. Clonal relationship among invasive and non-invasive strains of enteroinvasive *Escherichia coli* serogroups. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 172: 145-151.
51. 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.
52. Small PLC, Falkow S. Identification of Regions on a 230-Kilobase Plasmid from Enteroinvasive *Escherichia coli* That Are Required for Entry into HEP-2 Cells.

- Infect Immun 1988; 56: 225-229.
53. Taylor DN, Echeverria P, Sethabutr O, Pitarangsi C, Leksomboon U, Blacklow NR, Rowe B, Gross R, Cross J. Clinical and microbiologic features of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli infections detected by DNA hybridization. J Clin Microbiol. 1988; 26:1362-1366.
  54. Toledo MR, Reis MH, Almeida RG, Trabulsi LR. Invasive strain of Escherichia coli belonging to O group 29. J Clin Microbiol 1979; 9:288-289.
  55. Beutin L, Gleier K, Kontny I, Echeverria P, Scheutz F. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of Escherichia coli (EIEC) isolated in Germany. Epidemiol Infect. 1997; 118:199-205.
  56. Small PL, Isberg RR, Falkow S. Comparison of the ability of enteroinvasive Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Yersinia pseudotuberculosis, and Yersinia enterocolitica to enter and replicate within HEp-2 cells. Infect Immun. 1987; 55:1674-1679.
  57. Niesel DW, Chambers CE, Stockman SL. Quantitation of HeLa Cell Monolayer Invasion by Shigella and Salmonella Species. J Clin Microbiol 1985; 22: 897-902.
  58. Formal SB, Hornick RB. Invasive Escherichia coli. J Infect Dis 1978; 137:641-644.
  59. Okamura N, Nagai T, Nakaya R, Kondo S, Murakami M, Hisatsune K. HeLa cell invasiveness and O antigen of Shigella flexneri as separate and prerequisite attributes of virulence to evoke keratoconjunctivitis in guinea pigs. Infect Immun 1983; 39:505-513.
  60. Mehlman IJ, Eide EL, Sanders AC, Fishbein M, Aulisio CC. Methodology for recognition of invasive potential of Escherichia coli. J Assoc Off Anal Chem 1977; 60:546-562.
  61. Bourdet-Sicard R, Egile C, Sansonetti PJ, Tran Van Nhieu G. Diversion of cytoskeletal processes by Shigella during invasion of epithelial cells. Microbes Infect 2000; 2:813-819.
  62. Niebuhr K, Giuriato S, Pedron T, Philpott DJ, Gaits F, Sable J, Sheetz MP, Parsot C, Sansonetti PJ, Payrastre B. Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the S.flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology. EMBO J 2002; 21: 5069-

5078.

63. Sansonetti PJ. Bacterial pathogens, from adherence to invasion: comparative strategies. *Med Microbiol Immunol* 1993; 182:223-232.
64. Skoudy A, Nhieu GT, Mantis N, Arpin M, Mounier J, Gounon P, Sansonetti P. A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Cell Sci* 1999;112: 2059-2068.
65. Tran Van Nhieu G, Caron E, Hall A, Sansonetti PJ. IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J* 1999;18: 3249-3262.
66. Gouin E, Gantelet H, Egile C, Lasa I, Ohayon H, Villiers V, Gounon P, Sansonetti PJ, Cossart P. A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci* 1999;112:1697-1708.
67. Harris JR, Wachsmuth IK, Davis BR, Cohen ML. High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. *Infect Immun* 1982; 37:1295-1298.
68. Silva RM, Toledo MR, Trabulsi LR. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1980; 11:441-444.
69. Lior H. Classification of *Escherichia coli*. In: Gyles CL. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Cab International ed., Wallingford. 1994: 31-72.
70. 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.
71. Ike K, Kume K, Kawahara K, Danbara H. Serotyping of O and pilus antigens of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with coli-septicemia. *Jpn J Vet Sci* 1990; 52: 1023-1027.
72. Kapur V, White DG, Wilson RA, Whittam TS. Outer membrane protein patterns mark clones of *Escherichia coli* O2 and O78 strains that cause avian septicemia. *Infect Immun* 1992; 60: 1687-1691.
73. Peighambari SM, Vaillancourt JP, Wilson RA, Gyles CL. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. *Avian Dis* 1995; 39: 116-124.

74. Phukan A, Kalita CC, Dutta GN. Isolation, identification and serotyping of *Escherichia coli* from poultry. *Indian J of Animal Science* 1990; 60: 556-557.
75. Achtman M, Heuzenroeder M, Kusecek B, Ochman H, Caugant D, Selander RK, Vaisanen-Rhen V, Korhonen TK, Stuart S, Orskov F, et al. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect Immun* 1986; 51: 268-76.
76. Caya F, Fairbrother JM, Lessard L, Quessy S. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J Food Prot* 1999; 62: 741-746.
77. Kong RYC, Lee SKY, Law TWF, Law SHW, Wu RSS. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res* 2002; 36:2802-2812.
78. Murayama SY, Sakai T, Makino S, Kurata T, Sasakawa C, Yoshikawa M. The use of mice in the Sereny test as a virulence assay of shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1986; 51: 696-698.
79. Faundez G, Figueroa G, Troncoso M, Cabello FC. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. *J Clin Microbiol* 1988; 26:928-932.
80. Zhang LH, Fath MJ, Mahanty HK, Tai PC, Kolter R. Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics* 1995; 141: 25-32.
81. Wooley RE, Brown J, Gibbs PS, Nolan LK, Turner KR. Effect of normal intestinal flora of chickens on colonization by virulent colicin V-producing, avirulent, and mutant colicin V-producing avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 1994; 38: 141-145.
82. Smajs D, Karpathy SE, Smarda J, Weinstock GM. Colicins produced by the *Escherichia fergusonii* strains closely resemble colicins encoded by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 208: 259-62.
83. Ramírez SRM, Moreno SA, Almanza MY. Factores de virulencia de *Escherichia coli* aviar asociados a la colisepticemia en pollos de engorde. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33: 52-57.
84. Cloud SS, Rosenberger JK, Fries PA, Wilson RA, Odor EM. In vitro and in vivo

- characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. *Avian Dis* 1985; 29: 1084–1093.
85. Geornaras I, Hastings JW, Holy AV. Genotypic analysis of *Escherichia coli* strains from poultry carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:1940–1944.
  86. Kariuri S, Gilks C, Kimari J, Obanda A, Muyodi J, Waiyaki P, Hart CA. Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 472–476.
  87. Ngeleka M, Brereton L, Brown G, Fairbrother JM. 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.
  88. Ojeniyi AA. Direct transmission of *Escherichia coli* from poultry to humans. *Epidem Infect* 1989; 103: 513–522.
  89. Rosario CC, Puente JL, Verdugo-Rodriguez A, Anderson RC, Eslava CC. Phenotypic characterization of *ipaH*<sup>+</sup> *Escherichia coli* strains associated with yolk sac infection. *Avian Dis* 2005; 49:409-417.
  90. Irwin RJ, McEwen SA, Clarke RC, Meek AH. The prevalence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and antimicrobial resistance patterns of nonverocytotoxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* in Ontario broiler chickens. *Can J Vet Res* 1989; 53: 411–418.
  91. Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 1995; 14: 3015–3027.
  92. Kolar M, Panticek R, Bardon J, Vagnerova I, Typovska H, Valka I, Doskar J. Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry. *Vet Med Czech* 2002; 47: 52–59.
  93. Oppegaard H, Steinum TM, Wasteson Y. Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 3732–3734.
  94. Martinez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial

- infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 647–679.
95. Johnson TJ, Skyberg J, Nolan L K. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian Dis* 2004; 48: 351–360.
  96. Carson AC, Shear BL, Eilersieck MR, ASFAW A. Identification of Fecal *Escherichia coli* from Humans and Animals by Ribotyping. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1503–1507.
  97. Avery SM, Liebana E, Reid CA, Woodward MJ, Buncic S. Combined Use of Two Genetic Fingerprinting Methods, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Ribotyping, for Characterization of *Escherichia coli* O157 Isolates from Food Animals, Retail Meats, and Cases of Human Disease. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2806–2812.
  98. Bingen EH, Denamur E, Picard B, Goulet P, Lambert-Zechovsky NY, Brahim N, Mercier JC, Beaufils F, Elion J. Molecular epidemiology unravels the complexity of neonatal *Escherichia coli* acquisition in twins. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1896–1898.
  99. Picard B, Picard-Pasquier N, Krishnamoorthy R, Goulet P. Characterization of highly virulent *Escherichia coli* strains by ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 82: 183–188.
  100. Martin IE, Tyler SD, Tyler KD, Khakhria R, Johnson WM. Evaluation of ribotyping as epidemiologic tool for typing *Escherichia coli* serogroup O157 isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34:720-723.
  101. Pfaller MA, Mujeeb I, Hollis RJ, Jones RN, Doern GV. Evaluation of the discriminatory powers of the Dienes test and ribotyping as typing methods for *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1077-1080.
  102. Dalsgaard A, Echeverria P, Larsen JL, Siebeling R, Serichantalergs O, Huss HH. Application of ribotyping for differentiating *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from shrimp farms in Thailand. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 245-51.
  103. Nolan LK, Wooley RE, Brown J, Spears KR, Dickerson HW, Dekich M. Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and



the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 1992;36: 395-7.

104. Board RG, Clay C, Lock J, Dolman J. The egg: A compartmentalized aseptically packaged food. In: Board RG, Fuller R. *Microbiology of the Avian Egg*. Chapman & Hall. London 1994: 43-61.

**Cuadro 1. Distribución de los embriones de pollo de diferentes edades para determinar la edad de inoculación.**

Grupo	EDAD (días de incubación)			
	9	10	11	12
PBS Estéril <sup>a</sup>	5	5	15	10
K-12 <sup>b</sup>	20	10	15	15
CR-000089 <sup>b</sup>	10	10	15	15
FM-095785 <sup>b</sup>	25	10	10	15
<b>Total</b>	60	35	55	55

<sup>a</sup> El grupo fue inoculado con 100 µl de PBS estéril

<sup>b</sup> Los grupos fueron inoculados con 10<sup>2</sup> UFC/100 µl de la cepa correspondiente.

**Cuadro 2. Esquema de inoculación en el ensayo de letalidad en embrión de pollo.**

<b>Grupo*</b>	<b>Inóculo</b>	
	<b>Cepa</b>	<b>(UFC/100 µl)</b>
<b>Testigo Negativo</b>	PBS Estéril	--
<b>Testigo Negativo</b>	K-12	$1 \times 10^2$
<b>Testigo Positivo</b>	CR-000089	$1 \times 10^2$
<b>Prueba</b>	FM-095785	$1 \times 10^2$

\* Cada grupo constó de 25 embriones de 12 días de edad

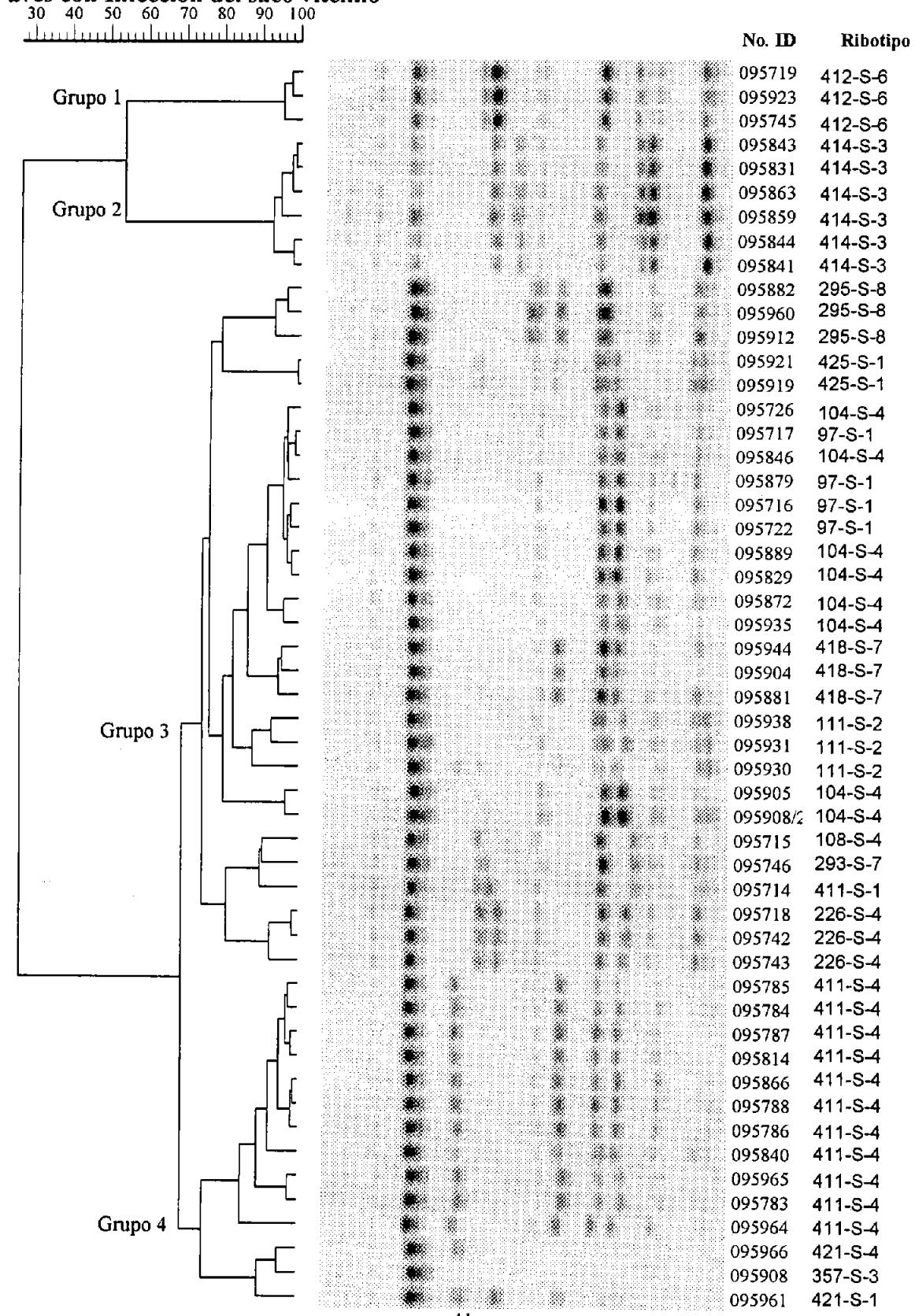
**Cuadro 3. Ribogrupos identificados en 52 cepas de *Escherichia coli ipaH+* aislados a partir de aves con infección del saco vitelino**

<b>Ribogrupo<sup>a</sup></b>	<b>Número de Cepas (%)</b>	<b>Serotipo (Número de cepas)<sup>b</sup></b>
97-S-1	4 (7.7)	O?:H8 (3), O115:H10 (1)
104-S-4	8 (15.4)	O81:H31 (1), O12:H31 (1), O?:H31 (3) O?:H7 (1), OR:H31 (1), O?:H4 (1)
108-S-4	1 (1.9)	O6:H16 (1)
111-S-2	3 (5.8)	O19:NM (2), OR:NM (1)
226-S-4	3 (5.8)	O146:H19 (1), O112:H19 (2)
293-S-7	1 (1.9)	O103:H11 (1)
295-S-8	3 (5.8)	O167:H4 (1), OR:H9 (1), OR:H4 (1)
357-S-3	1 (1.9)	OR:H31 (1)
411-S-1	1 (1.9)	O9:H11 (1)
411-S-4	10 (19.2)	O2:NM (10)
412-S-6	3 (5.8)	O2:H? (1), OR:NM (1), O168:NM (1)
414-S-3	6 (11.5)	OR:H9 (2), O78:H? (1), O78:H9 (3)
414-S-4	1 (1.9)	O84:H8 (1)
418-S-7	3 (5.8)	O84:H8 (2), O84:NM (1)
421-S-1	1 (1.9)	O8:H21 (1)
421-S-4	1 (1.9)	O2:NM (1)
425-S-1	2 (3.8)	O22:H4 (2)

<sup>a</sup> Número de identificación que asigna la maquina *Riboprimer*

<sup>b</sup> 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 chicken with yolk sac infection. *Avian Dis* 2004; 48: 791-802.

**Figura 1. Dendograma de los ribogrupos encontrados en cepas de *E. coli* aisladas de aves con Infección del saco vitelino**

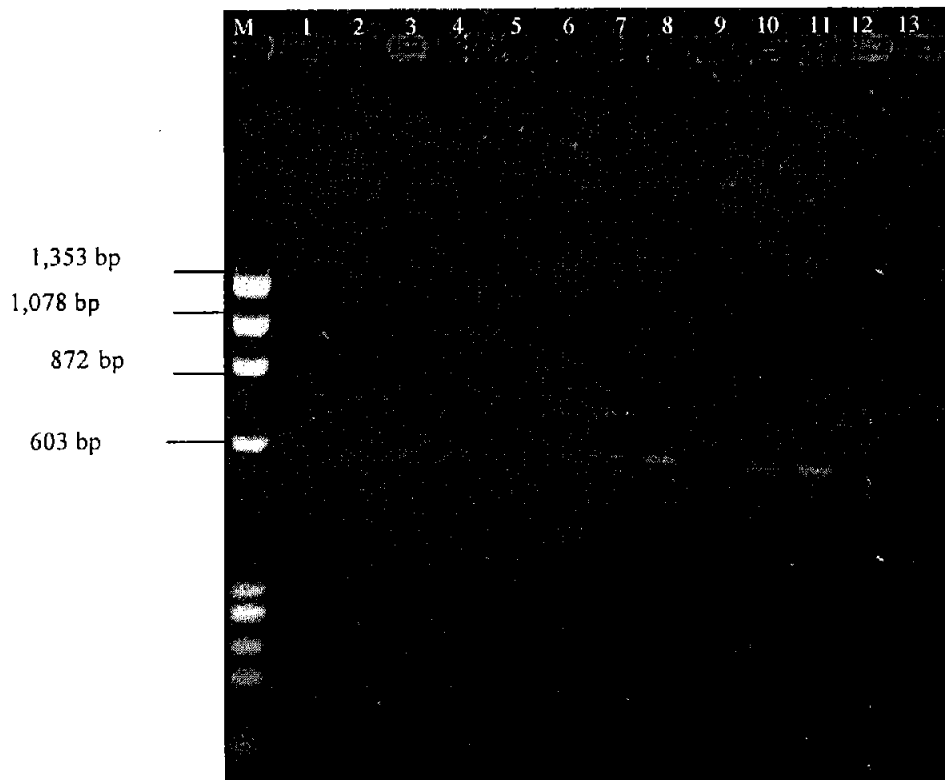


**Cuadro 4. Cepas de *E. coli* aisladas a partir de aves con infección del saco vitelino positivas a la prueba de PCR para IS630**

Cepa	Origen <sup>A</sup>	Serotipo	Ribotipo
095783	PE18 3° día H	O2NM	411-S-4
095785	PE18 3° día SV	O2NM	411-S-4
095784	PE19 3° día H	O2NM	411-S-4
095786	PE20 3° día H	O2NM	411-S-4
095787	PE21 3° día H	O2NM	411-S-4
095788	PE21 3° día SV	O2NM	411-S-4
095789	PE23 3° día H	O2NM	ND <sup>B</sup>
095791	PE25 3° día H	O2NM	ND

<sup>A</sup> PE = Pollo de Engorda, # = Número de identificación del ave, 3° día = día de muerte del ave, H = Hígado, SV = Saco Vitelino

<sup>B</sup> ND = No determinado

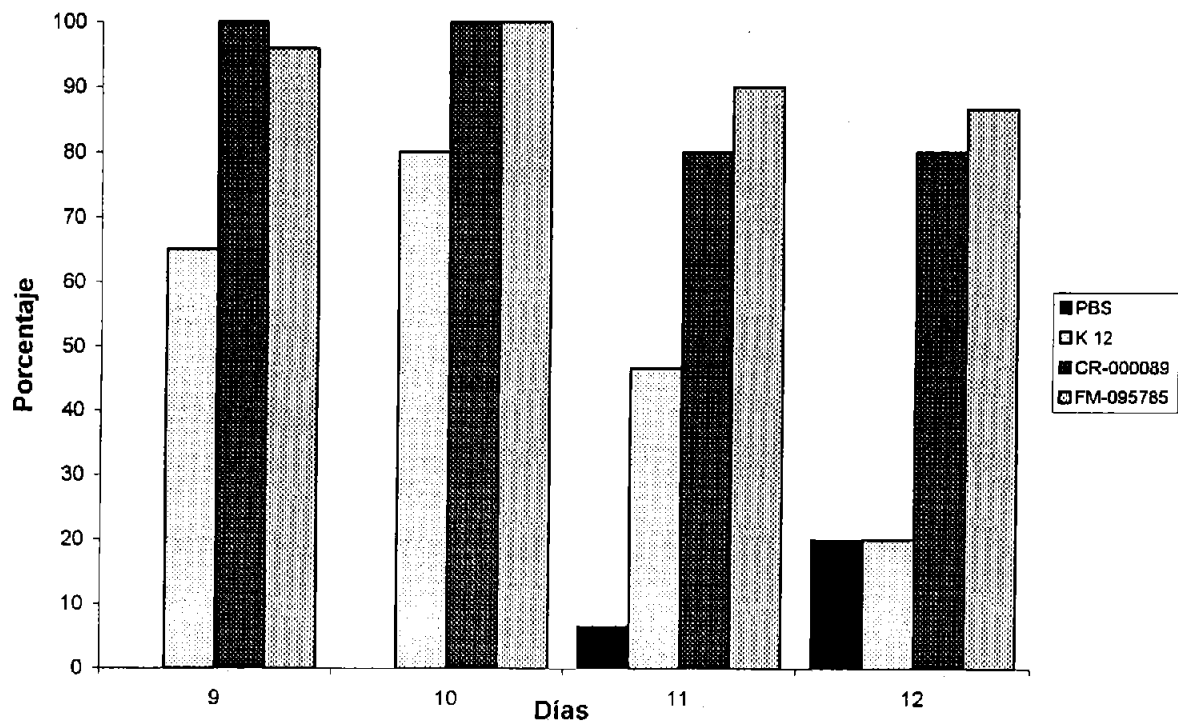


**Figura 2. Productos de PCR para los iniciadores obtenidos de *IS630* .  
En gel de agarosa al 1% . En el carril M se encuentra el marcador *Hae* III digerido de  $\Phi$  X 174. En las líneas 10 y 11 se encuentran las cepas de *E. coli* O28ac EIEC y *S. sonnei* I (testigos positivos). En las líneas 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 12 se observan cepas positivas.**

**Cuadro 5. Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de letalidad en embriones de pollo, inoculados a 4 diferentes edades de incubación con tres cepas de *Escherichia coli***

Inóculo	Días Post-Inoculación				Total	% Mortalidad
	1	2	3	4		
<b>Día 9</b>						
PBS	0	0	0	0	0/5	0
K 12	3	10	0	0	13/20	65
CR-000089	4	5	1	0	10/10	100
FM-095785	10	12	2	0	24/25	96
<b>Día 10</b>						
PBS	0	0	0	0	0/5	0
K 12	4	3	1	0	8/10	80
CR-000089	6	3	1	0	10/10	100
FM-095785	8	2	0	0	10/10	100
<b>Día 11</b>						
PBS	0	1	0	0	1/15	6.6
K 12	3	2	2	0	7/15	46.6
CR-000089	2	5	3	2	12/15	80
FM-095785	3	4	2	0	9/10	90
<b>Día 12</b>						
PBS	2	0	0	0	2/10	20
K 12	0	1	0	2	3/15	20
CR-000089	2	7	1	2	12/15	80
FM-095785	3	7	2	1	13/15	86.6





**Figura 3. Porcentaje de mortalidad durante el ensayo de letalidad en embriones de pollo, inoculados a 4 diferentes edades de incubación con las cepas CR-000089 (testigo positivo), K-12 (testigo negativo) y FM-095785 de *Escherichia coli*; así como con PBS estéril.**

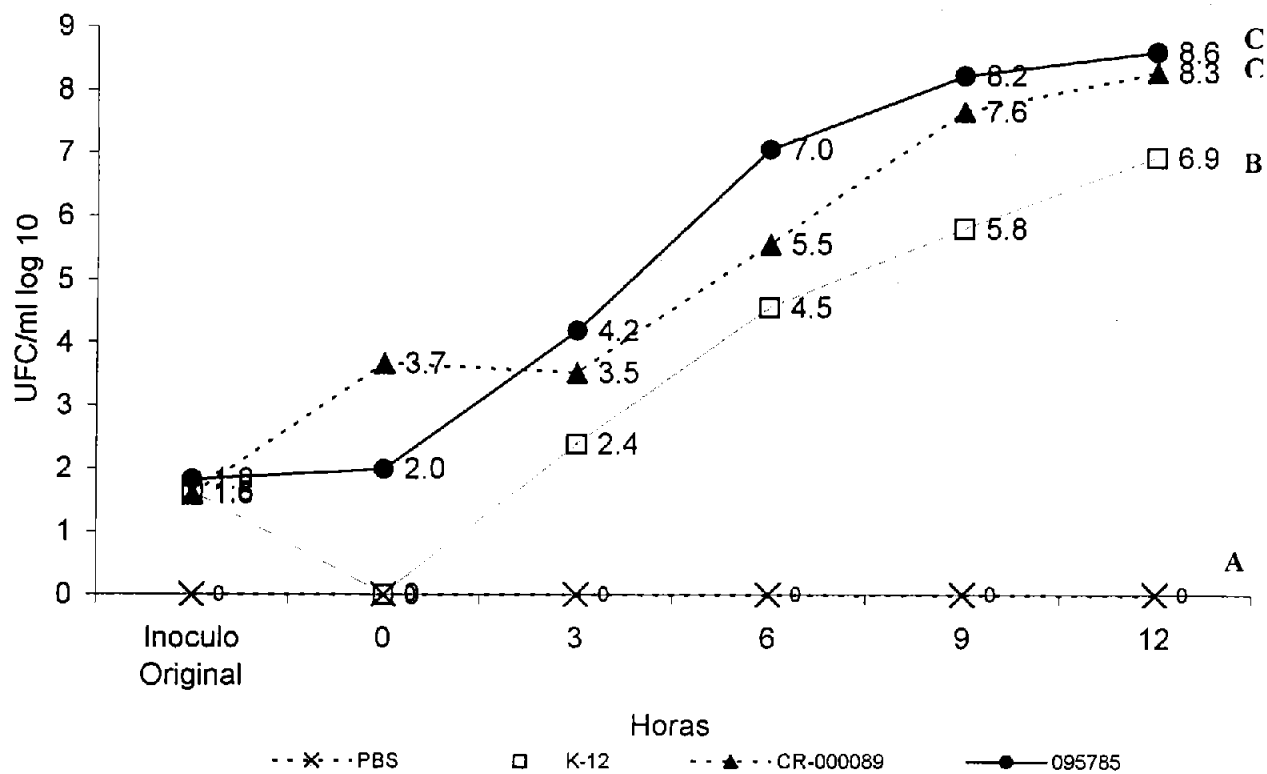
**Cuadro 6. Modelo de Crecimiento Bacteriano en embriones de 12 días de edad inoculados con tres cepas de *Escherichia coli* (K-12, CR-000089 y FM-095785).**

GRUPO	UFC/ml log <sub>10</sub> (Promedio ±DS*)				
	0 H <sup>1</sup>	3 H	6 H	9 H	12 H
<b>PBS</b>	0.0 ± 0.0 a <sup>2</sup>	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
<b>K-12</b>	0.0 ± 0.0 a	2.39 ± 1.41 b	4.54 ± 0.75 b	5.77 ± 0.91 b	6.89 ± 0.92 b
<b>CR-000089</b>	3.66 ± 0.87 b	3.51 ± 0.59 bc	5.53 ± 0.60 c	7.63 ± 0.52 c	8.25 ± 0.39 c
<b>FM-095785</b>	1.99 ± 1.13 c	4.17 ± 0.37 c	7.03 ± 0.52 d	8.20 ± 0.25 c	8.57 ± 0.22 c

\* Desviación estándar

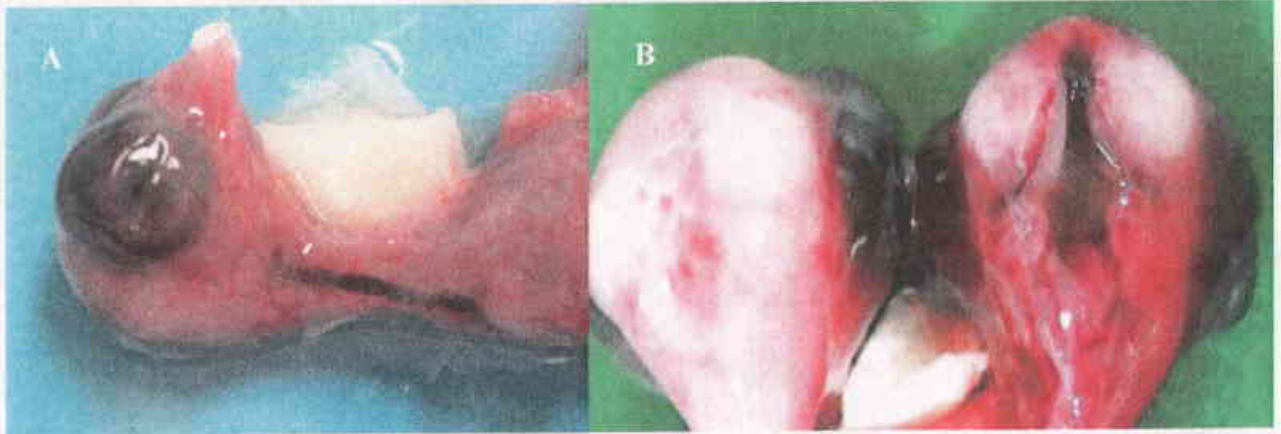
<sup>1</sup> Tiempo expresado en horas después de la inoculación.

<sup>2</sup> Grupos con diferente literal en la misma columna son diferentes estadísticamente (P < 0.0001)



Grupos a las 12 horas con diferente literal son diferentes estadísticamente ( $P < 0.0001$ )

**Figura 4. Modelo de Crecimiento Bacteriano en embriones de pollo a los 12 días de edad inoculados con tres cepas de Escherichia coli (K-12, CR-000089, FM-095785).**



**Figura 5. Embriones inoculados con diferentes cepas de *E. coli* a los 12 días de incubación. A, Congestión de la vena yugular en un embrión de inoculado. B, Embrión no inoculado (izq.) y congestión de la parte posterior del cráneo en un embrión inoculado con la cepa FM-095785 de *E. coli* (der.).**

# Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs, and neonatal broilers with yolk sac infection

Cecilia Rosario Cortés,\* Guillermo Téllez Isaías,\* Carlos López Cuello,\* Jorge Mateo Villaseca Flores,\*\* Robin C. Anderson,\*\* Carlos Eslava Campos\*\*\*

Vol. 46, Nums. 1-2  
January - March, 2004  
April - June, 2004  
pp. 12 - 16

**ABSTRACT.** Yolk sac infection (YSI) is a major cause of mortality of broilers during the first week post-hatching. The aim of the present study was to analyze the possible sources of fertile egg contamination and to establish the etiology of YSI. Sixty fertile eggs, sixty sawdust samples from the nest, sixty nonfertile 19 to 21 day old incubation eggs and liver and yolk sac samples from 216 dead, 1 to 7 day old chicks, were cultured. Five hundred and eighty eight colonies were isolated and further characterized using biochemical tests. *Escherichia coli* was the most common bacterium recovered from all samples except the sawdust and fertile eggs collected from the nest. Fertile egg contamination at breeder farm level was found to be minimal. In broilers, both mortality and the rate of *E. coli* isolation were increased with the time. These results suggest that egg contamination does not occur at the breeders farm, as previously has been reported. Bacterial contamination causing YSI in vertically integrated operations can occur at a latter stage. It can be considered that the main etiologic agent of YSI is *E. coli*, since YSI mortality was highly correlated with *E. coli* isolation.

**Key words:** *Escherichia coli*, yolk sac infection, poultry.

**RESUMEN.** La infección del saco vitelino (ISV) es la principal causa de mortalidad en pollo durante la primera semana. El objetivo del presente estudio fue identificar la posible fuente de contaminación del huevo fértil, para determinar la etiología de la ISV. Se seleccionaron sesenta muestras de cama de nido, huevo de nido, huevo a los 19 y 21 días de incubación, y muestras de saco vitelino e hígado de 216 pollitos muertos durante la primera semana. Se obtuvieron 588 aislados; la identificación bioquímica mostró que *Escherichia coli* era el microorganismo más común en todas las muestras, excepto en las de nido y el huevo de nido. La contaminación del huevo fértil en la granja de reproductoras fue mínima. En pollo de engorda, el aislamiento de *E. coli* se incrementó en relación con la mortalidad observada. Los resultados obtenidos sugieren que la contaminación del huevo no ocurre en la granja de reproductoras, como ha sido propuesto, ya que ésta puede ocurrir en etapas posteriores. Con respecto a la etiología de la ISV, *E. coli* fue el principal agente etiológico identificado.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, infección del saco vitelino, aves.

## INTRODUCTION

In Mexico, poultry meat is the most important source of animal protein ingested by the general population. According to the Unión Nacional de Avicultores, the *per capita* consumption of poultry meat will increase from 21.68 kg in 2002 to 22.36 kg in 2003 (<http://www.una.com.mx>).

Yolk sac infection (YSI) is a major cause of mortality in broilers during their first week of life.<sup>1,5,10</sup> YSI occurs in all flocks resulting in decreased hatchability, increased mortality and increased cull rate due to retarded growth.<sup>5,11,17</sup> YSI occurs mainly due to bacterial contamination of the eggshell at the broiler breeder farm, shortly after the egg is laid, while the cuticle is still moistened. Contamination-promoting factors include lack of hygiene in the nests, presence of eggs on the floor, incubation of dirty eggs or eggs with eggshell defects, and collection of dirty and clean eggs at the same time.<sup>5,10,17</sup>

Alternatively, poor fertile egg storage conditions, poor egg disinfection, and high humidity levels during incubation may also promote YSI.<sup>1</sup> Another important route of contamination of the yolk sac is the bacterial penetration through a poorly healed navel.<sup>5,17</sup>

*Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus cereus*, and *Enterococcus*, are some bacteria that have been isolated from YSI-positive birds. Nevertheless the most common isolated bacterium is *E. coli*.<sup>1,5,10,17</sup>

*Escherichia coli* is an ubiquitous pathogen distributed throughout the world that causes significant economic losses to commercially produced poultry.<sup>4,26,31</sup>

In the present study, potential sources of fertile egg contamination were investigated to establish the etiology of YSI in a vertically integrated operation located at Central Mexico.

## MATERIAL AND METHODS

All samples were obtained from a vertically integrated poultry operation located at Guanajuato State, Mexico.

**Nest management and fertile egg collection.** At the onset of lay, sawdust was placed in the nests and formaldehyde

\* Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ, UNAM. Circuito Exterior: 04510 Ciudad Universitaria, México D.F. México

\*\* USDA/ARS, Southern Plains Agricultural Research Center, 2881 F&B Rd., College Station, TX 77845 USA.

\*\*\* Departamento de Salud Pública, FM, UNAM. Circuito Exterior 04510, Ciudad Universitaria, México, D.F. México



(10 g) was added. Dirty material was removed and replaced with clean sawdust. Egg collection was performed 4 times per day. Prior to egg collection, workers washed and disinfected their hands using a quaternary ammonium-based product. Once collected in plastic flats, eggs were disinfected by fumigation with formaldehyde gas and then stored at 18°C for 1-2 days until transferred to the hatchery.

**Fertile egg/nest samples.** Sixty non-disinfected eggs and sixty sawdust samples (10 g) collected from the same nest were analyzed.

**Hatchery.** At 19 days of incubation, (at the time of incubator-to-hatcher transfer) sixty infertile eggs were obtained from the same breeder flock. On hatch day, at sorting time, 60 piped, dead-in-shell eggs were taken.

**Broilers.** The offspring from the same breeder flock was followed up. Samples of liver and yolk sac were obtained from 216 birds that died during the first week of life. These samples were individually placed in sterile plastic bags for transportation. Samples were kept in refrigeration until they were analyzed within the two hours following collection.

**Bacterial isolation.** McConkey Agar (McC) and Trypticase Soy Agar (TSA) (DIFCO Laboratories, Detroit MI, USA) were used to culture all the samples. Eggs from the broiler breeder farm and eggs from the hatchery were rinsed with PBS (10 ml). One ml of this solution was inoculated onto the above-mentioned culture media. The egg content was sampled with a loop and plated onto McC and TSA.

Yolk sac samples from 21 day old eggs were grown in both McC and TSA. Liver and yolk sac samples were also obtained from birds that had died during the first week post-hatch and these were plated onto McC and TSA. All inoculated media were incubated at 37.5°C for 24 hours. Based on morphology, all different bacterial colonies were selected from each sample. These colonies were isolated in pure culture for further identification.

**Bacterial identification.** The identification of the isolated colonies was performed using standard bacteriological and biochemical procedures as described by Ewing<sup>9</sup> and Barrow & Feltham.<sup>3</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

YSI is an economically important disease since it increases 8-day mortality and causes poor weight gain. In addition, birds that survive to a YSI outbreak show poor carcass quality.<sup>27</sup> Isolation frequency of the microorganisms found in the different samples from breeder farm, hatchery and broiler farm is summarized in Table 1. A total of five hundred and eighty eight strains were isolated. Even though isolates representing a great diversity of genera were recovered, *E. coli* (45.5%) and *Enterobacter aerogenes* (17.9%) were the most common. These results are similar to those obtained by Harry<sup>12</sup> who pointed out that *E. coli* was one of the microorganisms most frequently associated with YSI.

In the present study, fertile egg contamination at the broiler breeder farm level was found to be minimal. Only 22 isolates (22/588; 3.7%) were obtained from nest sawdust samples. Several authors had reported earlier that contamination of fertile eggs in the nest at the broiler breeder farm is the main cause of YSI.<sup>10,17,24</sup> However, in the present study *Staphylococcus aureus* was the most common bacterium isolated at the breeder farm (17 strains) and these had no significant impact in the mortality of broilers, since only one strain of this microorganism was isolated from dead chicks (Table 1). It is known that micrococci (*Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp.) can be the predominant contaminants on the shell of clean eggs in the nest, however these organisms do not appear to be pathogenic for newly hatched chickens.<sup>25</sup>

Table 1. More common microorganisms isolated from different samples collected from the breeder farm, hatchery and broiler farm.

Strain	Breeders Farm		Hatchery		Broilers Mortality	Total
	Nest material	Fertile eggs	19 <sup>th</sup> day	21 <sup>st</sup> day		
<i>Escherichia coli</i>		4 (0.7)	28 (4.8)	47 (8)	188 (32)	267 (45.5)
<i>Enterobacter aerogenes</i>			2 (0.3)	6 (1)	97 (16.5)	105 (17.9)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					56 (9.5)	56 (9.5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 (2.9)*	2 (0.3)	12 (2)	20 (3.4)	1 (0.2)	52 (8.8)
Yeast					14 (2.4)	27 (4.6)
<i>Streptococcus</i> spp.	3 (0.5)		2 (0.3)	16 (2.7)	5 (0.8)	26 (4.4)
Others	2 (0.3)	2 (0.3)	14 (2.4)	2 (0.3)	35 (6)	55 (9.3)
Total	22 (3.7)	8 (1.3)	58 (9.9)	105 (17.9)	395 (67.2)	588

\* Number inside the parenthesis represent the percentage with respect to the total of isolates (588)

From non-disinfected eggs collected at breeder farm, only 8 strains were isolated (8/588; 1.3%), and 4 of them were identified as *E. coli*. These results suggest that egg contamination does not always occur at the broiler breeder farm, as previously reported.<sup>10</sup> Other bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* have been reported as a potential pathogens able to contaminate fertile eggs at the breeder farm,<sup>30</sup> but in our study the rate of contamination of eggs at the breeder farm was extremely low compared with later stages and most of the contamination was by gram positive bacteria (*S. aureus* and *Streptococcus* spp.), whereas *Pseudomonas* spp. was only isolated at broilers farm.

It seems to be more likely that contamination occurs after the fertile eggs have been transported to the hatchery. In a study where eggs from large poultry breeding plants and other from family breeders were analyzed results showed that eggs from the family breeders were almost free of pathogens.<sup>21</sup> Moreover, the incidence of YSI increased after 1930 with the advent of commercial hatcheries<sup>14</sup> showing that a higher rate of fertile egg contamination occurs outside the breeder farm. This observation is supported by the increase of isolates at the hatchery compared with those obtained in the same batch at the breeder farm in our study.

Fifty-eight (58/588; 9.9%) bacteria were isolated from eggs collected at 19 days of incubation (Table 1). Several researchers<sup>5,8,17,30</sup> have emphasized the importance of YSI as a cause of mortality even in the hatchery, which could increase the number of so-called "dead-in-shell" eggs, where our samples were collected. Forty-two percent of dead-in-shell ostrich embryos contained bacteria, where the most common isolate was *E. coli*.<sup>8</sup> Other isolates from dead-in-shell ostrich eggs and chicks included *Pseudomonas mesophila*, *P. pneumoniae*, *Serratia liquifaciens*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacter cloacae*. We also isolated *Alcaligenes* spp and *Enterobacter aerogenes* from the broiler embryos but the isolation frequency was low.

A total of 105 isolates (105/588; 17.9%) were obtained from 21 day old eggs (hatch day). *E. coli* (47 strains) was the most common bacteria isolated, followed by *S. aureus* (20 strains). At this stage, the presence of *Streptococcus* spp. (16 strains) and yeast (14 strains) was also observed. The high prevalence of gram negative bacteria, mainly *E. coli*, is likely due to the relatively simple nutritional requirements of *E. coli* and their ability to grow in the presence of the iron chelating agents like ovotransferrin.<sup>25</sup> More than one bacteria were isolated from 21 of the samples. In most cases *E. coli* or *S. aureus* were isolated with yeast and/or *Streptococcus* spp. (data not show), however, most of the later microorganisms were recovered from the

eggshell and thus are probably not important because they had not crossed the eggshell barrier. Yeast have not been reported as pathogens in chickens, but they have been isolated from the air and soil of poultry brooding and rearing houses, old litter, wet feed and birds droppings. Most of the reports of yeast in poultry are related with spoilage of fresh and processed carcasses.<sup>15,29</sup> However it is known that yeast colonies possess proteolytic and lipolytic activity.<sup>15</sup> This ability may play a role in the YSI by breaking down yolk sac constituents, and making nutrients more readily available for bacterial growth. Bacteria like *Staphylococcus* spp and *Streptococcus* spp have been reported as major contaminants at the hatchery and in a few cases they were more prevalent than *E. coli*.<sup>25</sup>

In the present study, a positive bacterial isolation was obtained from one hundred and eighty eight (87%) of the dead chicks at the broiler farm. A total of 395 different strains belong to different genera were isolated: *E. coli* (188/588; 32%), *E. aerogenes* (97/588; 16.5%) and *K. pneumoniae* (56/588; 9.5%) were the most common. Of these *E. coli* has been previously reported as one of the most prevalent organisms involved in the development of YSI.<sup>5-8,23,25</sup>

Other bacteria like *Aeromonas salmonicida*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* spp., *Chromobacterium* spp. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella* spp. *Proteus mirabilis*, *Providencia retgerii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia* spp., *Streptococcus* spp., and non-identified yeasts were isolated out of several samples but in a lower proportion than with those described above. In a limited number of reports it has been mentioned that microorganisms other than *E. coli* may cause mortality during the first week.<sup>30</sup> Additionally, it has been reported that *S. aureus* is an important cause of disease in poultry<sup>13,16</sup> and as a common isolate from the yolk sac and liver of broilers and turkeys.<sup>13,32</sup> Moreover, *S. aureus* is principally associated with bone and joints infections, abscesses and dermatitis.<sup>16,32</sup> On the other hand, a study using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to determine the origin of *S. aureus* strains from several hatcheries and broiler farms, revealed that the patterns of PFGE were related in both places, indicating an association between the presence of the strains in the hatchery and subsequent broiler flock infection.<sup>16</sup> However in our study this relationship could not be established because, despite the large amount of *S. aureus* strains recovered in breeders farm and hatchery, only one strain was found among the 216 examined chicks. *Pseudomonas aeruginosa* has been isolated from the hatchery and from chicks with omphalitis. *Pseudomonas aeruginosa* is mentioned as an opportunistic pathogen that is able to invade fertile eggs, causing death of embryos and creating a localized or systemic disease in newly hatched chicks.<sup>30</sup> However we did not find this



species but rather we isolated *P. fluorescens*. The ability of *Pseudomonas* spp. to cause infection of yolk sac of a chick is enhanced by its ability to degrade the proteins found in the yolk, creating the opportunity for other bacteria to multiply.<sup>30</sup>

The frequency of isolating *E. coli* from the different samples is summarized in Table 2. *Escherichia coli* was not found in sawdust samples which supports the hypothesis that nest is not the main source of contamination for fertile eggs. Four strains of *E. coli* were isolated from fertile eggs at the broiler breeder farm (4/267; 1.5%), 2 of them were isolated from the internal egg sample, whereas 2 were isolated from eggshell surface. Strains isolated from the eggshell could play an important role in the contamination of the embryo because it is known that pathogenic bacteria present in the faeces of breeders may contaminate the eggshell and penetrate the egg through shell pores.<sup>2</sup> Alternatively, if disinfection is performed inadequately, bacteria could remain in the surface of the egg and infect the chicks when they pipped the eggshell at hatching. Sixteen of the 28 strains isolated at 19 days of incubation were obtained from inside the egg and 12 from the eggshell. Many of the strains isolated in the present study were found in the eggshell. This means that they had not crossed the eggshell barrier. A more extensive characterization of our strains is required; in order to establish the relationship between these strains and to look for possible pathogenic markers previously described in *E. coli* strains.<sup>18-20,22,26,31</sup> Information obtained from such work could determine possible mechanisms involved in the pathogenesis of the YSI.

In broilers, one hundred and eighty eight *E. coli* strains were obtained, 102 of these were obtained from the liver and 86 (86/267; 32%) were from the yolk sac. Dzoma reported similar results when they analyzed yolk sac from ostriches samples with 22% of 80 yolk sacs being infected with different bacteria.<sup>8</sup> Generally, many of these same strains were isolated from liver as well as the yolk sac.

A correlation between the chick mortality and the frequency of isolation of *E. coli* was observed in the first week of life (Table 3). The mortality peak\* (25%) and *E. coli* isolation (37%) were observed at day 5. Mortality rate declined thereafter until 7 days post hatch which was the last day of our evaluation (Table 3). Our results show a similar pattern with those reported by Mosqueda & Lucio who indicated that the YSI mortality curve lasts 7-10 days, it peaks at 4-5 days and decreases during the following 3 to 5 days.<sup>17</sup> How-

Table 2. Frequency of isolation of *E. coli* from different sources.

Sample	<i>Escherichia coli</i>	Total (%)
Nest		
Sawdust (Nest)	0	0
Fertile egg		
Eggshell	2	
Inner sampling	2	4 (1.5)
19 <sup>th</sup> day		
Eggshell	12	
Inner sampling	16	28 (10.5)
21 <sup>st</sup> day		
Eggshell	29	
Yolk sac (Embryo)	18	47 (17.6)
Mortality		
Yolk sac	86	
Liver	102	188 (70.4)
Total	267	267

Table 3. Association between mortality and *E. coli* isolation in broilers during the first week of life.

Day	Number (%)	
	Dead chicks	<i>E. coli</i>
1	9 (4.17)	5 (2.66)
2	22 (10.19)	1 (0.53)
3	46 (21.30)	21 (11.17)
4	24 (11.11)	20 (10.64)
5	54 (25)	70 (37.23)
6	37 (17.13)	39 (20.74)
7	24 (11.11)	32 (17.02)
Total	216	188

ever, as mentioned above, mortality may not be the most important impact in this disease, as economic losses due to subsequent complications and condemnations at the slaughterhouse could seriously impact poultry production.

The results from this study indicate that bacterial contamination resulting in YSI in vertically integrated operations does not necessarily occur in the broiler breeder farm, but can occur at a latter stage. Despite the great diversity of bacteria isolated from yolk sac, *E. coli* appears to have been main cause of YSI. However, the mechanism that this microorganism use to cause the signs and lesions observed in this disease remains unknown. A more detailed study is needed in order to determine the relationship between different strains isolated here and to establish the pathogenic characteristics possessed by those strains. Ultimately, identification of potential virulence traits may allow for their use as specific markers for the diagnosis of pathogenic strains.

\* This percentage was obtained taking the amount of birds dead during week one as 100%.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank to the Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A.C. (ANECA) for the partial economical support for this work.

## REFERENCES

- Bains B.S. 1979. A Manual of poultry diseases. Roche Publishing, pp. 105-106, Switzerland.
- Barbour E.K., N.H. Nabbut, S.W. Hinners & H.M. Al-Nakhli. 1985. Reduction of bacterial infections in newly hatched chicks by the use of antimicrobial dips: preliminary approaches. *Vet. Q.*, 7:39-43.
- Barrow G.I. & R.K.A. Feltham. 1993. Cowan and Steel's Manual for the identification of Medical Bacteria 3rd edition. Cambridge University Press. pp. 21-45;50-164, New York, USA.
- Blanco J.E., M. Blanco, A. Mora & J. Blanco. 1997. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 35:2184-2185.
- Coutts G.S. 1981. Poultry diseases under modern management 2nd edition. Saiga Publishing Co. LTD. pp. 36-41. London. England.
- Davis M.F., G.M. Ebako & T.Y. Morishita. 2003. A golden comet hen (*Gallus gallus* forma domestica) with an impacted oviduct and associated colibacillosis. *J. Avian Med. Surg.*, 17:91-95.
- Druel R., R.P. Chin & M. Rezvani. 1996. Synovitis, osteomyelitis, and green liver in turkeys associated with *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, 40:417-424.
- Dzoma B.M. & G.M. Dorrestein. 2001. Yolk Sac Retention in the Ostrich (*Strutio camelus*): Histopathologic, anatomic, and physiologic considerations. *J Avian Med Surg* 15:81-89.
- Ewing W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae 4th edition. Elsevier Science Publishing Co. pp. 27-72;93-134. New York, USA.
- Gordon R.F. & F.T.W. Jordan. 1985. Enfermedades de las aves 2a edición. El Manual Moderno. pp. 54-56. México, D.F., México.
- Gross W.B. 1964. Retained caseous yolk sacs caused by *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, 8:438-441.
- Harry E.G. 1957. The effect on embryonic and chick mortality of yolk contamination with bacteria from hen. *Vet. Rec.*, 69:1433-1439.
- Hazariwala A., Q. Sanders, C.R. Hudson, C. Hofacre, S.G. Thayer & J.J. Maurer. 2002. Distribution of Staphylococcal enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from poultry and humans with invasive Staphylococcal disease. *Avian Dis.*, 46:132-136.
- Hungerford T.G. 1969. Diseases of poultry: Including cage birds and pigeons. 4th edition. Angus and Robertson. pp. 274-280. Australia.
- Ismail S.A.S., T. Deak, H.A. Abd El-Rahman, M.A.M. Yassien, & L.R. Beuchat. 2000. Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 62:113-121.
- McCullagh J.J., P.T. McNamee, J.A. Smyth & H.J. Ball. 1998. The use of pulsed field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in commercial broiler flocks. *Vet. Microbiol.*, 63:275-281.
- Mosqueda T.A. & M.B. Lucio. 1985. Enfermedades comunes de las aves domésticas. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 377-381. México, D.F., México.
- Nataro J.P., & J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:142-201.
- Ngeleka M., J.K.P. Kwaga, D.G. White, T.S. Whittam, C. Riddell, R. Goodhope, A.A. Potter & B. Allan. 1996. *Escherichia coli* cellulites in broiler chickens: Clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect. Immun.*, 64:3118-3126.
- Nolan L.K., C.W. Giddings, S.M. Horne, C. Doetkott, P.S. Gibbs, R.E. Wooley & S.L. Foley. 2002. 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.*, 46:386-392.
- Papadopoulou C., D. Dimitriou, S. Levidiotou, H. Gessouli, A. Panagiou, S. Golegou & G. Antoniadis. 1997. Bacterial strains isolated from eggs and their resistance to currently used antibiotics: is there a health hazard for consumers?. *Comp. Immun. Microbiol Infect Dis* 20:35-40.
- Panigrahy B. & L. Yushen. 1990. Differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* isolated from poultry. *Avian Dis.*, 34:941-943.
- Pinto da Rocha A.C.G, A. Bernardes da Silva, B. Guimaraes de Brito, H.L. Da Souza Moraes, P.A. Pontes, M.C. Cé, V. Pinheiro do Nascimento & S.C.T. Pippi. 2002. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the South of Brazil. *Avian. Dis.* 46:749-753.
- Rojo M.E. 1987. Enfermedades de las aves. 2a. Edición. Editorial Trillas. pp. 213-215. México, D.F., México.
- Seviour M.E., S.F. Sykes & G.R. Board. 1972. A microbiological survey of the incubated eggs of chickens and water-fowl. *Br. Poult. Sci.* 13:549-556.
- Skyberg J.A., S.M. Horne, C.W. Giddings, R.E. Wooley, P.S. Gibbs & L.K. Nolan. 2003. Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 47:1441-1447.
- Sojka W.J. 1965. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Commonwealth Agricultural Bureaux. pp. 157-169. London, England.
- Van den Bogaard A.E., N. London, C. Driessen & E.E. Stobberingh. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* 47:763-771.
- Viljoen B.C., I. Geornaras, A. Lamprecht & A. von Holy. 1998. Yeast populations associated with processed poultry. *Food Microbiol.*, 15:113-117.
- Walker S.E., J.E. Sander, J.L. Cline & J.S. Helton. 2002. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with mortality in broiler chick. *Avian Dis.*, 46:1045-1050.
- White D.G., M. Dho-Moulin, R.A. Wilson & T.S. Whittam. 1993. Clonal relationship and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb. Pathog.*, 14:399-409.
- White D.G., S. Ayers, J.J. Maurer, S.G. Thayer & C. Hofacre. 2003. Antimicrobial susceptibilities of *Staphylococcus aureus* isolated from commercial broilers in Northeastern Georgia. *Avian Dis.*, 47:203-210.

Correspondence to:

Cecilia Rosario Cortés

Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ, UNAM. Circuito Exterior 04510 Ciudad Universitaria, México D.F. México.

Telephone and Fax +52 55 56 22 58 67

E-mail: rosario@servidor.unam.mx

## Serotyping and Virulence Genes Detection in *Escherichia coli* Isolated from Fertile and Infertile Eggs, Dead-in-Shell Embryos, and Chickens with Yolk Sac Infection

C. C. Rosario,<sup>A</sup> C. C. López,<sup>A</sup> I. G. Téllez,<sup>C</sup> O. A. Navarro,<sup>B</sup>  
R. C. Anderson,<sup>D</sup> and C. C. Eslava<sup>B</sup>

<sup>A</sup>Departamento de Producción Animal, Aves, FMVZ

<sup>B</sup>Departamento de Salud Pública, FM UNAM, Circuito Exterior, 04510 Ciudad Universitaria, México, D.F. México

<sup>C</sup>Center of Excellence in Poultry Science O-114, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701

<sup>D</sup>Southern Plains Agricultural Research Center, USDA/ARS, 2881 F&B Road, College Station, TX 77845

Received 13 April 2004; Accepted 14 June 2004

**SUMMARY.** *Escherichia coli* is a common avian pathogen mainly associated with extraintestinal infections such as yolk sac infection (YSI). The aim of this study was to determine the serotypes and the presence of some virulence genes of *E. coli* strains isolated from different samples in a vertically integrated poultry operation in Mexico. Two hundred sixty-seven *E. coli* isolates from different samples were serotyped using rabbit serum against the 175 somatic (O) and 56 flagellar (H) antigens of the typing schema. Virulence genes were determined by colony blot hybridization, using DNA probes for *st*, *eae*, *agg1*, *agg2*, *bfp*, *it*, *cdt*, *slt*, and *ipaH* diarrhea-associated virulence factors. The serogroup of 85% of the strains was determined; O19 (12%), O84 (9%), O8 (6%), and O78 (5%) were the most common. Using the complete antigenic formula (O and H), O19:NM ( $n = 31$ ) was the serotype most frequently isolated from dead-in-shell embryos and in broilers that had died on the fourth, fifth, sixth, and seventh days after hatch. One hundred ten strains (41.2%) hybridized with one or more of the used probes. Of these, *ipaH* (72%), *eae* (30%), and *cdt* (27%) were the most common. Considering the origin of the respective isolates, 40% of the broiler farm strains were positive for at least one probe. Results show that some avian *E. coli* strains isolated in Mexico are included in avian pathogenic *E. coli* serotypes not previously reported, suggesting that they could be specific for this geographic area. The wide distribution of the *ipaH* gene among nonmotile strains suggests that this invasiveness trait could be important in YSI pathogenesis. On the other hand, some other genes could contribute to *E. coli* virulence during YSI.

**RESUMEN.** Serotificación y detección de genes de virulencia de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos a partir de huevos fértiles e infértiles, embriones muertos y pollos con infección del saco vitelino.

*Escherichia coli* es un patógeno aviar común asociado principalmente con infecciones extraintestinales tales como la infección del saco vitelino. Se determinó el serotipo y la presencia de algunos genes de virulencia de cepas de *E. coli* aisladas a partir de diferentes muestras obtenidas en una empresa avícola integrada de México. Se serotificaron 267 aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de las diferentes muestras empleando suero de conejo contra los antígenos somático (O) 175 y flagelar (H) 56 del esquema de tipificación. Se determinaron los genes de virulencia en las colonias de *E. coli* mediante hibridación de punto con sondas de ADN dirigidas contra los factores de virulencia asociados con diarrea *st*, *eae*, *agg1*, *agg2*, *bfp*, *it*, *cdt*, *slt* e *ipaH*. Se determinó el serogrupo del 85% de las muestras, siendo los serogrupos más comunes el O19 (12%), O84 (9%), O8 (6%) y el O78 (5%). Mediante el uso de la fórmula antigénica completa (O y H), se determinó que el serotipo aislado con mayor frecuencia a partir de embriones muertos y de pollitos de engorde muertos a los 4, 5, 6 y 7 días posteriores al nacimiento fue el O19 (31 aislamientos). Un total de 110 cepas (41.2%) hibridaron con una o más de las sondas empleadas. De estas, *ipaH* (72%), *eae* (30%) y *cdt* (27%) fueron las más comunes. Considerando

el origen de los aislamientos respectivos, el 40% de las cepas aisladas a partir de los pollos de engorde fueron positivas por lo menos a una sonda. Los resultados muestran que algunas cepas aviares de *E. coli* aisladas en México se encuentran incluidas en los serotipos patógenos aviares de *E. coli* no reportados con anterioridad, sugiriendo que estos aislamientos podrían ser específicos de esta zona geográfica. La amplia distribución del gen *ipaH* entre las cepas no móviles sugiere que esta característica de invasividad podría ser importante en la patogénesis de la infección del saco vitelino. Sin embargo, otros genes podrían contribuir a la virulencia de *E. coli* durante la infección del saco vitelino.

**Key words:** *Escherichia coli*, yolk sac infection, serotyping, DNA hybridization, virulence genes

**Abbreviations:** A/E = attaching and effacing; APEC = avian pathogenic *Escherichia coli*; BFP = bundle-forming pilus; CDT = cytotoxic distending toxin; EAEC = enteroaggregative *Escherichia coli*; EAF = entero adherent factor; EHEC = enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EIEC = enteroinvasive *Escherichia coli*; EPEC = enteropathogenic *Escherichia coli*; ETEC = enterotoxigenic *Escherichia coli*; H = flagellar antigen; H<sup>+</sup> = H nontypeable; HUS = hemolytic uremic syndrome; IpaH = invasion plasmid antigen H; LT = heat-labile toxin; O = somatic antigen; O<sup>+</sup> = O nontypeable; OR = O rough; SLT = *Shiga*-like toxin; ST = heat-stable toxin; YSI = yolk sac infection

Bacterial infections are of worldwide importance in commercially produced poultry, and their costs exceed \$100 million annually (4,17,44). *Escherichia coli* that cause disease in chickens are collectively known as avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) (29) and have been mainly associated with extra-intestinal infections such as air sacculitis, pericarditis, peritonitis, salpingitis, synovitis, osteomyelitis, cellulitis, and yolk sac infection (YSI) (13,21,29,44).

Before the use of *E. coli* serologic typing, the isolation of these bacteria from avian products was considered as external contamination. However, with the use of typing and some other procedures, the etiologic significance of *E. coli* in avian diseases has been assessed (19). Studies (2,21,27,41) have shown that O1, O2, O78, and O nontypeable (O<sup>+</sup>) are the serogroups most frequently associated with poultry.

Characteristics such as specific serotypes, colicin V production, fimbriae F1 type expression, embryo lethality, *iss* genetic element, temperature-sensitive hemagglutinin Tsh, host complement resistance, polysaccharide capsule, aerobactin iron-sequestering systems, and toxin or cytotoxin production are common features of APEC strains (12,13,17,18,28).

*Escherichia coli* is the most predominant facultative anaerobe of the colonic flora. However, several clones have evolved the ability to cause a broad spectrum of human diseases (36). Diarrheagenic *E. coli* strains include five major groups: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), and enteroinvasive *E.*

*coli* (EIEC) (31,36). The versatility of *E. coli* is due to the fact that different strains have horizontally acquired different virulence genes (45).

EPEC strains have been associated with acute and persistent diarrhea in the developing world among infants younger than 2 years. Although EPEC-like organisms associated with disease have been isolated from animals such as rabbits, pigs, and dogs, the serotypes found in these animals are usually not human serotypes (36). The hallmark of the infection due to EPEC is the attaching and effacing (A/E) histopathologic condition, which is characterized by effacement of microvilli and intimate adherence between the bacterium and the epithelial cell membrane. Intimin, an outer membrane protein, is an adhesin encoded by the *eae* gene (for *E. coli* A/E), and it is present in all EPEC and EHEC strains that produce the A/E lesion. The *eae* gene is essential for the virulence of EPEC strains, although additional virulence factors such as the bundle-forming pilus (BFP) are important in the virulence of these strains. The BFP is encoded by the structural gene *bfpA* (encoded on the entero adherent factor [EAF] plasmid) and is responsible for the localized adherence to HEP-2 cells (36,45).

First recognized as a cause of diarrheal disease in piglets, ETEC strains are now considered as a major cause of disease in children in developing countries and in adults traveling to ETEC-endemic (traveler's diarrhea) areas (45). The ETEC group is defined as *E. coli* strains that elaborate at least one of a defined group of enterotoxins, including heat-stable toxin (ST) and heat-labile toxin (LT); in both, the encoding genes are on plasmids (36,45).

The EAEC strains have been associated with persistent and bloody diarrhea in developing countries and some developed countries (45). The characteristic aggregative adherence pattern of EAEC is associated with the presence of large plasmids. In addition to their role in the pathogenesis of diarrheal disease, DNA probes that hybridize against fragments from those plasmids have been used as a rapid and sensitive genotypic screening technique for EAEC detection and diagnosis of EAEC infections (45,47).

EHEC were recognized as an emerging pathogen in 1982 in the United States (31). At that time, the rarely isolated serotype O157:H7 was identified in two outbreaks of hemorrhagic colitis associated with the ingestion of undercooked hamburgers at a fast-food restaurant chain. EHEC strains cause A/E lesions on epithelial cells and possess a 60-MDa plasmid (31,36). However, the major virulence factors and defining characteristics of EHEC are the *Shiga*-like toxins 1 and 2 (SLT1 and SLT2) associated with the hemolytic uremic syndrome (HUS) in developed countries (36). Although SLT-producing *E. coli* can be found in the fecal flora of a variety of animals, cattle are considered the most important reservoir in terms of human infection because most cases have been caused by ingestion of foods of bovine origin (36).

EIEC strains are closely related to *Shigella* species in biochemical, genetic, and pathogenic properties. Organisms have been shown to invade the colonic epithelium, a phenotype mediated by plasmid and chromosomal loci. The genes for invasiveness are carried on a 120-MDa plasmid in *Shigella* serotypes and in EIEC strains (36). *ipaH* is an invasion plasmid antigen that, unlike others such as *virA* (30), is present in multiple copies (in the invasion plasmid and the chromosome) (50).

Cytolethal distending toxin (CDT) was first described in certain *E. coli* strains (56); however, it is present in a large spectrum of gram-negative bacterial species such as *Campylobacter* species, *Shigella dysenteriae*, and *Haemophilus ducreyi* (1,11,36,42). This toxin induces characteristic elongation of eukaryotic cells followed by progressive cellular distension and death. Because this toxin is produced by several bacterial pathogens, it can be hypothesized that CDT is a virulence factor that enhances the ability of a specific strain to cause damage (36). CDT activity is encoded by three closely linked genes termed *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC*; these genes are adjacent on a large virulence plasmid (42).

Different virulence factors have been detected

within APEC strains, including several virulence markers of human diarrheagenic groups. Despite the enormous amount of knowledge regarding avian *E. coli* in some countries, the incidence of serotypes and the distribution of virulence genes among APEC strains in Mexico are unknown. This is one of the first attempts to determine the predominant serogroups of APEC strains in Mexico. Results from a previous investigation on the role of *E. coli* in YSI showed that this bacterium was the most frequently isolated from different samples (43). The aim of this study was to determine the most common serotypes and identifying virulence genes associated with diarrheagenic groups among *E. coli* strains isolated from cases of YSI in a vertically integrated poultry operation.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial identification and selection.** To identify the origin of YSI, a batch of fertile eggs was followed from the breeder farm through the hatchery and to the broiler farm in a vertically integrated poultry operation located at Guanajuato State (43). Briefly, samples from sawdust of the nest ( $n = 60$ ), non-disinfected fertile eggs at the breeder farm ( $n = 60$ ), infertile eggs ( $n = 60$ ), dead-in-shell embryos at the hatchery ( $n = 60$ ), and first-week mortality associated with YSI ( $n = 216$ ) were analyzed (5,14,43). From these, 267 *E. coli* isolates were identified (Table 1). In the present article, those *E. coli* strains were analyzed to determine their serologic identity and the presence of virulence genes associated with YSI.

**Serotyping.** Rabbit sera prepared against 175 somatic (O) and 56 flagellar (H) *E. coli* antigens (SERUNAM, Mexico City, Mexico), were used for serotyping as previously described by Orskov and Orskov (37). Forty-seven specific rabbit sera prepared against the different *Shigella* serogroups and three more prepared against Mexican *E. coli* strains that do not react with the recognized antiserum scheme were used.

**DNA hybridization.** The 267 *E. coli* strains were analyzed by colony dot hybridization using nine DNA probes designed for *E. coli* diarrheal-associated virulence factors (Table 2). All the probes were synthetic oligonucleotides (custom primers; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). The probes were labeled at the 5' end by the enzymatically catalyzed transfer of  $^{32}\text{P}$  from [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP (ICN Pharmaceuticals, Irvine, CA) with T4 polynucleotide kinase (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD), according to the procedure described by Sambrook *et al.* (46). The strains were cultured overnight in brain heart infusion at 37 C and spot-inoculated onto MacConkey agar plates (CM7B; Oxoid Inc., New York). Positive and negative controls were inoculated in each plate

Table 1. Isolation source of *E. coli* strains and positive DNA hybridization against different virulence probes.

Origin	No. of strains	Probes (No. of positive strains)						
		<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	<i>cdt</i>	<i>ipaH-eae</i>	<i>ipaH-cdt</i>	<i>eae-cdt</i>	<i>ipaH-eae-cdt</i>
Breeder farm								
Fertile eggs	4	2						
Hatchery								
Infertile eggs	28	8	1	1	4	1		
Dead in shell	47	3		5				
Broiler farm								
Liver <sup>A</sup>	102	21	7	5	3	2	1	6
Yolk sac <sup>A</sup>	86	17	7	2	7	3	1	3
Total	267	51	15	13	14	6	2	9

<sup>A</sup>Organs were obtained from first-week mortality at broiler farm.

according to the corresponding tested probe (Table 3). After overnight incubation at 37 C, the colonies were replicated by colony lift onto circular membranes (No. 541, Whatman, Clifton, NJ) and then lysed using the procedure described by Hill *et al.* (25).

A 50-ml hybridization mixture was prepared in a plastic tube just before use (25). One milliliter of salmon sperm was boiled for 10 min and added to the hybridization mixture. Five to 10 ml were dispensed into a plastic Petri dish containing the paper filters with the lysed bacterial colonies. The volume of the DNA-labeled probe solution was adjusted to contain  $1 \times 10^6$  counts per minute, and this was added to the hybridization solution containing the filters, mixed briefly, and incubated overnight at 41 C. The filters were removed from the hybridization mixture and rinsed for 5 to 10 sec in plastic Petri dishes containing 10 ml of  $6 \times$  SSC at 54 C and washed to eliminate the

free <sup>32</sup>P-labeled DNA probe, which was not specifically bound to the DNA of the lysed colonies. Filters were drained and covered again with  $6 \times$  SSC and incubated for 1 more hour at 50 C, at which time the filters were again drained, covered with  $6 \times$  SSC, and incubated for 1 more hour. Finally, the filters were rinsed for 5 to 10 sec in  $2 \times$  SSC and dried at room temperature. Results were visualized by autoradiography on film (XAR-2 in  $8 \times 10$ -inch size; Eastman Kodak, Rochester, NY) with intensifying screen cassettes and exposing during 48 hr at -70 C and developing according to the manufacturer's instructions.

## RESULTS

**Serotyping.** Forty-two different serogroups were identified among the 267 *E. coli* isolates

Table 2. Oligodeoxyribonucleotide probes used to identify *E. coli* virulence genes.

Virulence factor	Probe sequences	Source
<i>st1</i> <sup>A</sup>	5'-GCTGTGAATTGTGTTGTAATCC-3	Murray <i>et al.</i> (35)
<i>eae1</i> <sup>B</sup>	5'-ACGTTGCAGCATGGGTAAGTC-3	Blanco <i>et al.</i> (6)
<i>agg1</i> <sup>C</sup>	5'-CTGGCGAAAGACTGTATCAT-3	Schmidt <i>et al.</i> (47)
<i>agg2</i> <sup>C</sup>	5'-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT-3	Schmidt <i>et al.</i> (47)
<i>bfp</i> <sup>D</sup>	5'-GCTACGGTGTTAATATCTCTGGCG-3	Nataro and Kaper (36)
<i>ht-A</i> <sup>E</sup>	5'-GCGAGAGGAACACAAACCGG-3	Schultsz <i>et al.</i> (48)
<i>cdt</i> <sup>F</sup>	5'-CACGTCTGCAAGGCACTAC-3	Scott and Kaper (49)
<i>ipaH</i> <sup>G</sup>	5'-CTGGAGGACATTGCCCGGG-3	Venkatesan <i>et al.</i> (57)
<i>stH</i> <sup>H</sup>	5'-GATGATCTCAGTGGGCGTTC-3	Gunzer <i>et al.</i> (22)

<sup>A</sup>Heat-stable enterotoxin gene.

<sup>B</sup>*eae* Intimin gene.

<sup>C</sup>60-65-kDa plasmid.

<sup>D</sup>Bundle-forming pilus gene.

<sup>E</sup>Heat-labile enterotoxin gene.

<sup>F</sup>Cytolethal distending toxin gene.

<sup>G</sup>Invasion plasmid antigen H gene.

<sup>H</sup>*Shiga*-like toxin gene.

studied. The serogroups O19 (12%), O84 (9%), O8 (6%), and O78 (5%) were the most common (Table 4). The serogroup was not determined in 15% of the isolates; of these, 11% were rough (OR) and 4% were O?

The association between source of isolation and serogroup shows that O6, O9, and O152 *E. coli* strains were common in the breeder and broiler farms; O125 was identified only at the breeder farm and hatchery, whereas O3, O24, and O146 were isolated only at the hatchery (Table 5). In infertile eggs, the identified serogroups were O69, O70, O153, and O167, whereas O41 and O85 were found in dead-in-shell embryos. Twenty different serogroups were determined in strains recovered from the first-week broiler mortality (Table 5). The most frequently identified serogroups associated with YSI in broilers were OR, O19, O78, and O84, strains; of these, the latter two were isolated only at the broiler farm, whereas serogroups OR and O19 were isolated from broiler farm and hatchery samples.

During the identification of the flagellar antigens, it was observed that 30% of the strains were nonmotile. Of the motile strains, the most common were identified as possessing H:8 (12%), H nontypeable (H?) (9%), H:10 (8%), H:31 (6%), and H:11 (6%). The characterization of the strains using the complete antigenic formula showed that O19:NM ( $n = 31$ ) was the most common serotype isolated from dead-in-shell embryos and from broilers that died on the fourth, fifth, sixth, and seventh days after hatch. Another common serotype was OR:NM ( $n = 16$ ), isolated from infertile eggs and during the third mortality day of broilers.

**DNA hybridization.** One hundred ten strains (41.2%) hybridized with one or more of the follow probes: *ipaH*, *cdt*, and *eae* (Table 6). Of these, 80 strains were *ipaH* positive (72%), 40 were *eae* positive (30%), and 30 were *cdt* positive (27%). Some of these strains hybridized with more than one gene, showing different profiles; the most frequently observed was *ipaH-eae* (13%). Positive strains to *st1*, *agg1*, *agg2*, *bfp*, *lt-A*, and *slt* probes were not found.

The correlation between serogroup and gene hybridization shows that O78 ( $n = 6$ ) and O84 ( $n = 6$ ) serogroups and OR strains ( $n = 19$ ) were most frequently associated with the *ipaH* gene (Table 4); similarly, those serotypes showed a high correlation with the *eae* gene (4, 8, and 11 strains, respectively). On the other hand, the *cdt* gene was identified mainly on OR ( $n = 13$ ), O19 ( $n = 4$ ), and O2 ( $n = 3$ ).

The correlation between origin of the strains and DNA hybridization shows that four strains were

Table 3. Positive and negative controls of *E. coli* strains used in the DNA hybridization assay.

Strain	Serotype	Group	Genes
E3787	O26:H11	EHEC	<i>slt1</i>
E32511	O157:H-	EHEC	<i>eae1</i>
E2347	O127:H6	EPEC	<i>eae1</i> , <i>bfp</i> , <i>cdt</i>
E60725	O92:H33	EAEC	<i>agg1</i>
E66438	O75:H-	EAEC	<i>agg2</i>
E7476	O166:H27	ETEC	<i>st1</i>
E5798	O7:H18	ETEC	<i>ltA</i>
E35990	O143:H-	EIEC	<i>ipaH</i>
14R519	K12	None	Negative control

isolated from the breeder farm, but only two of them were positive for the *ipaH* probe (Table 1). Regarding samples from the hatchery, many of the strains isolated from infertile eggs and from dead-in-shell embryos were also positive in the hybridization test. For the samples from the broiler farm, more than 40% of the strains were positive for at least one probe. The gene association *ipaH-eae-cdt* was identified in the strains isolated from the liver and yolk sac; however, the same gene combination was not observed in previous stages of production. Considering the association between the occurrence of the genes and mortality, the fifth day was when most of the strains carrying the *ipaH* gene were isolated (Table 6), although the *ipaH*-positive strains were isolated from the third until the seventh days of mortality. The *ipaH* gene was not observed before the third day of mortality (Table 6). The *cdt* gene was identified in the strains isolated during the last incubation stage (dead-in-shell embryos) and in the first 4 days in the broiler house, but not later.

## DISCUSSION

YSI is considered the major cause of first-week mortality in broilers (3,10,20). YSI occurs when fertile eggs are contaminated, mainly by *E. coli* (3,10,23,33). One of the more common difficulties in diagnosing and controlling avian colibacillosis is that specific virulence markers have not been found in APEC strains (15,26).

Although more than 50,000 different *E. coli* serotypes exist, only a few are associated with disease (38). For this reason, the use of serotyping could continue to help to determine the epidemiologic importance of APEC strains in different avian diseases.

Nontypeable strains of APEC are common; studies (2,7,9,19,24,27,41) have shown that be-

Table 4. Serotypes and virulence genes of *E. coli* strains isolated from different samples.<sup>A</sup>

Serotype	Serogroup	Total No. of analyzed strains	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	<i>cdt</i>	Serotype	Serogroup	Total No. of analyzed strains	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	<i>cdt</i>
O2:H1	6 (2.25)	1	+	-	-	O85:NM	2 (0.75)	2	-	-	-
O2:H8		1	+	+	-	O91:H7	4 (1.50)	2	-	-	-
O2:NM		2	+	-	+	O91:H7		1	-	-	+
O2:NM		1	+	+	+	O91:H7		1	+	-	-
O2:NM		1	+	-	-	O103:H11	10 (3.75)	6	-	-	-
O3:H1	2 (0.75)	1	+	-	-	O103:H11		1	+	-	-
O3:NM		1	+	-	-	O103:NM		3	-	-	-
O4:H11	1 (0.37)	1	-	-	-	O108:H19	3 (1.12)	1	-	-	-
O6:H16	2 (0.75)	1	+	-	-	O108:H?		1	-	-	-
O6:H?		1	+	-	-	O108:NM		1	-	-	-
O7:H18	2 (0.75)	2	-	-	-	O112:H19	6 (2.25)	1	-	+	-
O8:H9	17 (6.37)	1	-	-	-	O112:H19		1	-	-	-
O8:H19		4	-	-	-	O112:H51		2	-	-	-
O8:H49		3	-	-	-	O112:H51		2	+	-	-
O8:H?		3	-	-	-	O118:H31	7 (2.62)	4	+	-	-
O8:H?		1	+	-	-	O118:H31		3	-	-	-
O8:NM		1	-	-	+	O120:H10	11 (4.12)	8	-	-	-
O8:NM		4	-	-	-	O120:H25		1	+	-	-
O9:H11	6 (2.25)	3	-	-	-	O120:H25		1	-	-	-
O9:H11		1	+	-	-	O120:NM		1	-	-	+
O9:H11		1	-	+	-	O124:H10	1 (0.37)	1	+	-	-
O9:H25		1	-	-	-	O125:H8	3 (1.12)	2	+	-	-
O12:H31	3 (1.12)	2	-	-	-	O125:H8		1	-	-	-
O12:H31		1	-	+	-	O132:H42	1 (0.37)	1	-	-	-
O15:H9	6 (2.25)	1	-	-	-	O146:H19	5 (1.87)	3	-	-	-
O15:H10		3	-	-	-	O146:H19		1	+	-	-
O15:H44		1	-	-	-	O146:H28		1	-	-	-
O15:H45		1	-	-	-	O149:H23	2 (0.75)	1	-	-	+
O19:H8	33 (12.36)	1	-	-	-	O149:H23		1	-	-	-
O19:H8		1	+	-	-	O152:H6	4 (1.50)	2	-	+	+
O19:NM		24	-	-	-	O152:H6		1	-	-	-
O19:NM		4	-	-	+	O152:H11		1	-	-	-
O19:NM		2	+	-	-	O153:NM	1 (0.37)	1	-	-	-
O19:NM		1	-	+	-	O155:H10	10 (3.75)	7	-	-	-
O21:NM	2 (0.75)	1	-	-	-	O155:H10		2	+	-	-
O21:NM		1	+	+	-	O155:H31		1	+	-	-
O22:H4	5 (1.87)	3	+	-	-	O167:H4	3 (1.12)	1	-	-	-
O22:H4		2	-	-	-	O167:H4		1	+	-	-
O23:H16	1 (0.37)	1	-	-	-	O167:H4		1	+	+	-
O24:H?	3 (1.12)	1	-	-	-	O168:H?	6 (2.25)	2	-	-	-
O24:H?		1	+	+	-	O168:H?		1	+	-	-
O24:NM		1	-	-	-	O168:NM		1	+	-	-
O41:H45	3 (1.12)	3	-	-	-	O168:NM		1	+	+	-
O44:NM	5 (1.87)	3	-	-	-	O168:NM		1	-	-	+
O44:NM		2	-	-	+	OR:H1	29 (10.86)	2	-	-	-
O53:H25	3 (1.12)	2	-	-	-	OR:H2		1	+	-	-
O53:NM		1	+	+	+	OR:H4		1	+	+	-
O69:H38	2 (0.75)	1	+	+	-	OR:H5		1	+	-	-
O69:H38		1	-	-	-	OR:H8		2	-	+	-
O70:H?	1 (0.37)	1	-	-	-	OR:H8		1	+	-	-
O73:H55	3 (1.12)	1	-	-	-	OR:H9		1	+	+	-
O73:NM		2	-	-	-	OR:H11		1	-	-	-



Table 4. Continued.

Serotype	Serogroup	Total No. of analyzed strains	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	<i>cdt</i>	Serotype	Serogroup	Total No. of analyzed strains	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>	<i>cdt</i>
O77:H?	1 (0.37)	1	-	-	-	OR:H31		2	-	-	-
O78:H9	13 (4.87)	4	-	-	-	OR:H?		1	+	-	-
O78:H9		3	+	+	-	OR:NM		2	+	-	-
O78:H9		3	+	-	-	OR:NM		7	+	+	+
O78:H9		1	-	+	-	OR:NM		4	+	-	+
O78:H33		1	-	-	-	OR:NM		2	-	-	+
O78:H?		1	-	-	-	OR:NM		1	-	-	-
O81:H31	2 (0.75)	1	-	-	-	O?:H5	10 (3.75)	3	+	-	-
O81:H31		1	+	-	-	O?:H5		1	+	+	-
O83:H4	3 (1.12)	3	-	-	-	O?:H31		1	+	-	-
O84:H8	24 (8.99)	12	-	-	-	O?:H?		1	-	-	-
O84:H8		6	-	+	-	O?:NM		2	-	+	-
O84:H8		4	+	-	-	O?:NM		2	-	-	-
O84:H8		1	+	+	-						
O84:H31		1	+	+	-						

<sup>A</sup>Samples were nondisinfected fertile eggs, infertile eggs, dead-in-shell embryos, and mortality during the first week. Data are given as number (percentage) among 267 strains unless otherwise indicated.

tween 61% and 67% of the strains are nontypeable. In the present study, the serotype of 85% of the isolates was determined. A possible explanation for the high percentage of serogroups identified in our study could be the use of a complete scheme of recognized O antigens and the short period between the isolation and typing, as the identification was performed a few days after the isolation.

The existence of certain specific serotypes depends on conditions such as geographic area, country, and time of isolation (27,41). In a study (53) performed in Hokkaido, Japan, the researchers initially determined that O60, O53, and O1 were the most frequently isolated serogroups, whereas in a subsequent study, the predominant serogroups were O1, O2, O8, and O78 (53). Surveys in other countries have revealed that the most common serogroups isolated from sick chickens were O1, O2, and O78 (9,12,13,19,44,58,59). In Mexico, this is one of the first attempts to determine the predominant serogroups of APEC strains. Although O19 (12%) was the most common, O78 and O2 serogroups were also identified in our study. These results are consistent with the variability of serogroups and serotypes of APEC strains identified around the world (9,12,13,19,44,58,59).

The O1 serogroup has been related principally with septicemic processes (53). In our study, the O1 serogroup was not identified, possibly because none

of the strains of this study were isolated from septicemic chickens.

Our data show that the serogroups isolated from infertile and dead-in-shell embryos at the hatchery were the same as those associated with mortality at the broiler farm. These observations agree with earlier reports that mention that, while the hatchery and the breeder farm could act as sources of bacterial contamination, the breeder farm is the main source for YSI (10,20,33).

EIEC causes a disease in humans that resembles bacillary dysentery. A common characteristic of these strains is that, like *Shigella* species, they have the ability to invade the epithelial cells of the colon (34). In fact, EIEC and *Shigella* strains are nonmotile bacteria that are biochemically and genetically related (36). Cloud *et al.* (9) reported that 41.6% of the *E. coli* strains isolated from the hatchery and from broilers were nonmotile. Similarly, a high percentage (71%) of *E. coli* isolates in the present study were nonmotile, suggesting that these could be related to EIEC strains.

*ipaH* is an invasion plasmid antigen that, unlike others such as *virA* (30), is present in multiple copies (in the invasion plasmid and the chromosome) (50); therefore, *ipaH* is often used as a diagnostic tool for EIEC detection. A high incidence (30%) of strains carrying the *ipaH* gene was observed in our study. This percentage is even

Table 5. Most common serogroups identified in *E. coli* strains isolated from different sources.

Serogroup	Eggs		Dead-in-shell embryos	Broilers	Total
	Fertile	Infertile			
O2		1	1	4	6
O3		1	1		2
O6	1			1	2
O8			7	10	17
O9	1			5	6
O15				6	6
O19			20	13	33
O24		2	1		3
O41			3		3
O69		2			2
O78				13	13
O84				24	24
O85			2		2
O91				4	4
O103		2	1	7	10
O108			1	2	3
O118				7	7
O120			8	3	11
O125	1	2			3
O146		4	1		5
O149			1	1	2
O152	1			3	4
O155				10	10
O167		3			3
OR		4		25	29
O?		1		9	10
O22, O44				5	10
O70, O153		1			2
O112, O168		2		4	12
O7, O21, O81				2	6
O12, O53, O73, 83				3	12
O4, O23, O77, O124, O132				1	5

higher than in another study performed in human populations (40). The wide distribution of the *ipaH* gene among our strains, especially among nonmotile strains, suggests that invasiveness could play an important role in YSI pathogenesis.

The serotypes O28ac, O29, O42, O112 ac, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O164, and O167 have traditionally been considered as EIEC strains (31,32,36,51,54). Studies (40,52) have demonstrated that the serotype identification alone is not sufficient to determine an *E. coli* strain as diarrheagenic. Although we recovered some serotypes traditionally belonging to EIEC, O112 ( $n = 6$ ), O124 ( $n = 1$ ), O152 ( $n = 4$ ), and O167 ( $n = 3$ ), only five of these strains were positive for the *ipaH* gene in the DNA hybridization. Conversely, numerous isolates belonging to serotypes not pre-

viously reported as EIEC were found to harbor the *ipaH* gene. However, as previously mentioned, the existence of specific serotypes depends on different conditions (27,41), and we acknowledge that these strains were isolated from a host different from those in which EIEC has been traditionally isolated (34).

Formal and Hornick (16) mention that a smooth lipopolysaccharide is required for penetration into and multiplication within epithelial cells. However, in our study, many rough strains were genotypically *ipaH* positive and positive in an *in vitro* invasiveness assay (data not shown).

The diarrheagenic EPEC group has been associated with infant diarrhea in the developing world (36). The presence of the *eae* gene, along with the absence of *stx*, is sufficient to define EPEC, because

Table 6. Mortality and virulence genes in *E. coli* strains isolated from first-week mortality on broiler farm.<sup>A</sup>

Day	Mortality	<i>ipaH</i>	<i>cdt</i>	<i>eae</i>	<i>ipaH-cdt</i>	<i>ipaH-eae</i>	<i>cdt-eae</i>	<i>ipaH-cdt-eae</i>
1	4.17		3.53					
2	10.19							
3	21.30	1.18	3.53		5.88			10.59
4	11.11	1.18	1.18	2.35			2.35	
5	25.00	20.00		14.12		11.76		
6	17.13	10.59						
7	11.11	11.76						

<sup>A</sup>Data are given as percentages.

possession of this sequence correlates with the existence of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island (36). Some other virulence markers are not conserved in all EPEC strains, such as EAF plasmid; for example, several strains in which *bfpA* is absent have been isolated (55). On the other hand, EPEC strains are included in certain recognized O:H serotypes (36). Nataro and Kaper (36) reported that, although EPEC-like organisms have been implicated in animal diseases, the serotypes found in those cases are usually not human serotypes. Similar results were seen in the present work, as only one isolate was identified as *eae* positive from 14 strains belonging to EPEC serogroups (O44 [ $n = 5$ ], O112 [ $n = 6$ ], and O125 [ $n = 3$ ]).

EPEC and EHEC strains harbor *eae* genes; however, only EHEC strains carry *stx* genes (8,36). Forty isolates of this study were positive for the *eae* gene, but all were negative for the *stx* gene. This observation suggests that our strains are typical EPEC strains. However, because two types of SLTs have been described (36), it is necessary to analyze both genes to demonstrate that our strains do not belong to the EHEC group. In a study by Kariuki *et al.* (29), it was mentioned that the APEC group mainly consists of EPEC and ETEC serovars. Our results are consistent with those observations, because 50 strains included within the reported ETEC serovars were identified. Of these O6 ( $n = 2$ ), O8 ( $n = 17$ ), O9 ( $n = 6$ ), O15 ( $n = 6$ ), O78 ( $n = 13$ ), O85 ( $n = 2$ ), O153 ( $n = 1$ ), and O167 ( $n = 3$ ) were the more common serogroups. ETEC strains elaborate at least one member of the two defined groups of enterotoxins: ST and LT. However, in our study, all the isolated strains were negative for *st* and *lt* genes in the DNA hybridization assay (36).

The frequency of *cdt*-positive strains was low (10%) in this study, compared with the number of strains harboring the *ipaH* and *eae* genes. However,

these data are consistent with another report (42). A correlation between serotype and CDT production has not been established. Pandrey *et al.* (39) recently reported that CDT production seemed to be a common feature of O86a and O127a *E. coli* strains. Our results show that *cdt*-positive strains were associated principally with O19 and OR strains (Table 4). Several investigations have been carried out to establish the pathogenic potential of this toxin, but statistically significant differences between healthy and diseased patients have not been found (1). In contrast to earlier results indicating that CDT-expressing *E. coli* strains belong to classic EPEC (39), we did not observe a preferential association of CDT with EPEC strains, because only 2 (both O44 strains) of our 11 strains belonging to the classic EPEC serogroups (O44, O112, and O12) carried the *cdt* gene (Table 4), although the production of CDT has been reported not to be limited to EPEC strains (56). Recently, Tóth *et al.* (56) determined that OR strains are able to produce CDT; this finding is similar to our observations, because one of the most important CDT-producing groups was OR. These authors identified a novel variant of CDT among intestinal and extraintestinal strains of human, avian, and porcine origin. At least four different types of CDT are known (56), and because a given strain is able to harbor only one of them; the prevalence of *cdt*-positive strains could be underestimated (56).

In the present work, the application of conventional and molecular approaches to the screening and characterization of *E. coli* strains was done. To our knowledge, this is the first systematic report that presents the prevalence of serotypes in the Mexican poultry industry. The serogroups identified among YSI-related strains have not been previously reported as pathogens in chickens, and some strains carried virulence genes that had been exclusively observed in humans. Moreover, our results suggest

that the strains identified as causative agents of YSI in Mexico are endemic to this region. Although most of our strains carried the *ipaH* gene characteristic of invasive strains, suggesting that invasiveness could play a role in YSI, further characterization of these strains is needed to determine if the invasive phenotype is expressed and to clarify their specific participation in the pathogenesis of YSI.

## REFERENCES

1. Albert, M. J., S. M. Faruque, A. S. G. Faruque, K. L. Bettelheim, P. K. B. Neogi, N. A. Bhuiyan, and J. B. Kaper. Controlled study of cytotoxic distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.* 34:717-719. 1996.
2. Allan, B. J., J. V. Van den Hurk, and A. A. Potter. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Can. J. Vet. Res.* 57:146-151. 1993.
3. Bains, B. S. A manual of poultry diseases. Editions "Roche," Basel, Switzerland. pp. 105-106. 1979.
4. Barnes, J. H., J. P. Vaillancourt, and W. B. Gross. Colibacillosis. In: *Diseases of poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, ed. Iowa State Press, Iowa City, IA. pp. 631-656. 2003.
5. Barrow, G. I., and R.K.A. Feltham. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3rd ed. Cambridge University Press, New York. pp. 21-45, 50-164. 1993.
6. Blanco, J.E., M. Blanco, J. Blanco, A. Mora, L. Balaguer, M. Mourino, A. Juarez, and W. H. Jansen. O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 34:3101-3107. 1996.
7. Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, W. H. Jansen, V. García, M. L. Vázquez, and J. Blanco. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet. Microbiol.* 61:229-235. 1998.
8. Chizhikov, V. A. Rasooly, K. Chumakov, and D. D. Levy. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3258-3263. 2001.
9. Cloud, S. S., J. K. Rosenberger, P. A. Fries, R. A. Wilson, and E. M. Odor. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. I: serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. *Avian Dis.* 29:1084-1093. 1985.
10. Coutts, G. S. Poultry diseases under modern management. 2nd ed. Saigo Publishing Co. Ltd, London, England. pp. 36-41. 1981.
11. De Rycke, J. and E. Oswald. Cytotoxic distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? *FEMS Microbiol. Lett.* 203:141-148. 2001.
12. Dho-Moulin, M, and J. M. Fairbrother. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299-316. 1999.
13. Dias da Silveira, W, A. Ferreira, M. Brocchi, L. M. de Hollanda, A. F. Pestana de Castro, Y. A. Tatsumi, and M. Lancellotti. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 85:47-53. 2002.
14. Ewing, W. H. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., New York. pp. 27-72, 93-134. 1986.
15. Foley, S. L., S. M. Horne, C. W. Giddings, M. Robinson, and L. K. Nolan. *iss* from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 44:185-191. 2000.
16. Formal, S. B., and R. B. Hornick. Invasive *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 137:641-644. 1978.
17. Gibbs, P. S., and R. E. Wooley. Comparison of the intravenous chicken challenge method with the embryo lethality assay for studies in avian colibacillosis. *Avian Dis.* 47:672-680. 2003.
18. Gibbs, P. S., J. J. Maurer, L. K. Nolan, and R. E. Wooley. 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.* 47:370-379. 2003.
19. Glantz, P. J., S. Narotsky, and G. Bubash. *Escherichia coli* serotypes isolated from salpingitis and chronic respiratory disease of poultry. *Avian Dis.* 6:322-328. 1962.
20. Gordon, R. F., and F. T. W. Jordan. Enfermedades de las aves, 2nd ed. El Manual Moderno ed., Cuauhtemoc, México. pp. 54-56. 1985.
21. Gross, W. G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles, ed. Cab International ed., Wallingford, United Kingdom. pp. 237-259. 1994.
22. Gunzer, F., H. Böhm, H. Rüssmann, M. Bitzan, S. Aleksic, and H. Karch. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 30:1807-1810. 1992.
23. Harry, E. G. The effect on embryonic and chick mortality of yolk contamination with bacteria from hen. *Vet. Rec.* 69:1433-1439. 1957.
24. Hemsley, R. V., D. A. Barnum, and D. G. Ingram. Biochemical and serological studies of avian strains of *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 11:90-97. 1967.
25. Hill, W. E., W. L. Payne, R. J. Crouch, V. M. Davis, L. L. English, J. L. Ferreira, P. Gemski, J. A. Jagow, S. L. Moseley, C. W. Noah, R. P. Silver, E. Singleton, S. D. Weagant, J. A. Wohlhieter, D. D. Womble, and D. L. Zink. Genetic methods for the detection of microbial pathogens: identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67:801-807. 1984.
26. Horne, S. M., S. J. Pfaff-McDonough, C. W. Giddings, and L. K. Nolan. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 44:179-184. 2000.
27. Ike, K., K. Kume, K. Kawahara, and H. Danbara. Serotyping of O and pilus antigens of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with coli-septicemia. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52:1023-1027. 1990.

28. Jeffrey, J. S., L. K. Nolan, K. H. Tonooka, S. Wolfe, C. W. Giddings, S. M. Horne, S. L. Foley, A. M. Lynne, J. O. Ebert, I. M. Elijah, G. Bjorklund, S. J. Pfaff-McDonough, R. S. Singer, and C. Doerkott. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis.* 46:48-52. 2002.
29. Kariuki, S., C. Gilks, J. Kimari, J. Muyodi, B. Getty, and A. Hart. Carriage of potentially pathogenic *Escherichia coli* in chickens. *Avian Dis.* 46:721-724. 2002.
30. Kong, R. Y. C., S. K. Y. Lee, T. W. F. Law, S. H. W. Law, and R. S. S. Wu. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiple PCR. *Water Res.* 36:2802-2812. 2002.
31. Levine, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389. 1987.
32. Lior, H. Classification of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles, ed. Cab International, Wallingford, United Kingdom. pp. 237-259. 1994.
33. Mosqueda, T. A., and M. B. Lucio. Enfermedades comunes de las aves domésticas. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México. pp. 377-381. 1985.
34. Murayama, S. Y., T. Sakai, S. Makino, T. Kurata, C. Sasakawa, and M. Yoshikawa. The use of mice in the Sereny test as a virulence assay of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 51:696-698. 1986.
35. Murray, B.E., J. J. Mathewson, H. L. Du Pont, and W. E. Hill. Utility of oligodesoxyribonucleotide probes for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 155:809-811. 1987.
36. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. Diarrheagenic *Escherichia coli* [published correction appears in *Clin. Microbiol. Rev.* 11:403. 1998]. *Clin. Microbiol.* 11:142-201. 1998.
37. Orskov, F., and I. Orskov. Serotyping of *Escherichia coli*. In: *Methods of microbiology*, vol. 14. T. Bergan, ed. Academic Press, London, England. pp. 43-112. 1984.
38. Orskov, F., and I. Orskov. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* 38:699-704. 1992.
39. Pandrey, M., A. Khan, S. C. Das, B. Sarkar, S. Kahali, S. Chakraborty, S. Chattopadhyay, S. Yamasaki, Y. Takeda, G. B. Nair, and T. Ramamurthy. Association of cytolethal distending toxin locus *cdtB* with enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* 41:5277-5281. 2003.
40. Phantouamath, B., N. Sithivong, S. Insisiengmay, N. Higa, C. Toma, N. Nakasone, and M. Iwanaga. The incidence of *Escherichia coli* having pathogenic genes for diarrhea: a study in the People's Democratic Republic of Lao. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56:103-106. 2003.
41. Phukan, A., C. C. Kalita, and G. N. Dutta. Isolation, identification and serotyping of *Escherichia coli* from poultry. *Indian J. Anim. Sci.* 60:556-557. 1990.
42. Pickett, C. L., and C. A. Whitehouse. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol.* 7:292-297. 1999.
43. Rosario, C. C., I. G. Téllez, C. C. López, F. J. Villaseca, R. C. Anderson, and C. C. Eslava. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs and neonatal broilers with yolk sac infection. *Rev. Latinoam. Microbiol.* In press. 2004.
44. Rosenberger, J. K., P. A. Fries, S. S. Cloud, and R. A. Wilson. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*, II: factors associated with pathogenicity. *Avian Dis.* 29:1094-1107. 1985.
45. Salyers, A. A., and D. D. Whitt. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains. In: *Bacterial pathogenesis a molecular approach*, 2nd ed. American Society of Microbiology, Washington. pp. 407-421. 2002.
46. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York. pp. 10.11-10.70. 1989.
47. Schmidt, H., C. Knop, S. Franke, S. Aleksic, J. Heeseman, and H. Karch. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 33:701-705. 1995.
48. Schultsz, C., G. J. Pool, R. van Ketel, B. de Wever, P. Speelman, and J. Dankert. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:2393-2397. 1994.
49. Scott, D.A., and J. B. Kaper. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* 62:244-251. 1994.
50. Sethabutr, O., M. Venkatesan, S. Yam, L. W. Pang, B. L. Smoak, W. K. Sang, P. Echeverria, D. N. Taylor, and D. W. Isenbarger. Detection of PCR products of the *ipaH* gene from *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by enzyme linked immunosorbent assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37:11-16. 2000.
51. Silva, R. M., R. F. Toledo, and L. R. Trabulsi. Biochemical and cultural characterization of invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 11:441-444. 1980.
52. Sunabe, T., and Y. Honma. Relationship between O-serogroup and presence of pathogenic factor genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.* 42:845-849. 1998.
53. Takahashi, K., and S. Miura. O groups and antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* isolated from diseased chickens. *Jpn. J. Vet. Res.* 16:65-72. 1968.
54. Taylor, D. N., P. Echeverria, O. Sethabutr, C. Pitarangsi, U. Leksomboon, N. R. Blachlow, B. Rowe, R. Gross, and J. Cross. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 26:1362-1366. 1988.
55. Toma, C., Y. Lu, N. Higa, N. Nakasone, I. Chinen, A. Baschkier, M. Rivas, and M. Iwanaga.

- Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 41:2669–2671. 2003.
56. Tóth, I., F. Héroult, L. Beutin, and E. Oswald. Production of cytotoxic distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.* 41:4285–4291. 2003.
57. Venkatesan, M., J. M. Buisse, E. Vandendries, and D. J. Kopecko. Development and testing of invasion-associated DNA probes for detection of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 26:261–266. 1988.
58. White, D. G., M. Dho-Moulin, R. A. Wilson, and T. S. Whittam. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb. Pathog.* 14:399–409. 1993.
59. Whiteman, C. E., and A. A. Bickford. Avian disease manual, 2nd ed. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, pp. 72–75. 1983.

## Phenotypic Characterization of *ipaH*<sup>+</sup> *Escherichia coli* Strains Associated with Yolk Sac Infection

C. C. Rosario,<sup>A</sup> J. L. Puente,<sup>B</sup> A. Verdugo-Rodríguez,<sup>C</sup>  
R. C. Anderson,<sup>D</sup> and C. C. Eslava<sup>E</sup>

<sup>A</sup>Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ, UNAM, Circuito Exterior 04510 Ciudad Universitaria, México, D.F. México

<sup>B</sup>Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, México

<sup>C</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ, UNAM, Circuito Exterior 04510 Ciudad Universitaria, México, D.F. México

<sup>D</sup>USDA/ARS, Southern Plains Agricultural Research Center, 2881 F&B Road, College Station, TX 77845

<sup>E</sup>Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Exterior 04510, Ciudad Universitaria, Mexico, D.F. México

Received 7 January 2005; Accepted 10 May 2005

**SUMMARY.** Seventy-six *Escherichia coli* serotypes possessing the *ipaH* gene typical of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) strains were characterized. Biochemical identification of our strains shows positive reactions for lactose fermentation (100% of strains), lysine decarboxylase (98.7% of strains) and motility (67.1% of strains), properties that do not correspond with those described to the EIEC group. The serotypes agree with an initial classification. In this, some common O antigens identified among *ipaH*<sup>+</sup> strains were O2 ( $n = 20$ ), OR ( $n = 11$ ) and non-determined O? ( $n = 10$ ). The O2:NM serotype was the most common. Sixty-six percent ( $n = 50$ ) of the *ipaH*<sup>+</sup> *E. coli* strains were colicin producers, of them, 26 (34%) produced Col V and other colicins, 13 (17%) produced colicins other than Col V, and 11 (14.5%) produced Col V only. Trimethoprim/Sulfa (72%), ampicillin (64.5%), enrofloxacin (55.3%), and ciprofloxacin (47.4%) were the major antimicrobial resistance frequencies observed. Twenty-five different multiresistance patterns were observed, where sixty-six strains (86.8%) were included. A MIC test showed that most of the strains were sensitive to low gentamicin and kanamycin concentrations, whereas most of the strains were resistant to tetracycline. An invasiveness assay showed that the predominant alterations caused to HEp-2 cells were changes in shape and staining, and in most of the specimens, a partial monolayer detachment was also seen. Fifteen strains invaded more than 30% of the monolayer cells, causing the formation of intercellular bridges or filipoidal-like protrusions. The results suggest the existence of specific clone complexes derived from EIEC strains adapted to the avian host. To our knowledge, this is the first study that demonstrates the presence of extraintestinal invasive *E. coli* (ExIEC) strains.

**RESUMEN.** Caracterización fenotípica de cepas *ipaH*<sup>+</sup> de *Escherichia coli* asociadas con la infección del saco vitelino.

Se caracterizaron setenta y seis serotipos de *Escherichia coli* portadoras del gen *ipaH*, característico de las cepas de *E. coli* invasoras del intestino. La identificación bioquímica de estas cepas mostró reacciones positivas a la fermentación de la lactosa (100% de las cepas), lisina decarboxilasa (98.7% de las cepas), y motilidad (67.1% de las cepas), propiedades que no corresponden con aquellas descritas para el grupo de cepas de *E. coli* invasoras del intestino. Los serotipos concordaron con una clasificación inicial en la cual se identificaron algunos antígenos comunes entre las cepas *ipaH*<sup>+</sup> tales como el antígeno O2 ( $n = 20$ ), OR ( $n = 11$ ) y el antígeno O no determinado ( $n = 10$ ). El serotipo O2:NM fue el serotipo más común. El 66% ( $n = 50$ ) de las cepas de *E. coli ipaH*<sup>+</sup> fueron productoras de colicinas, de las cuales 26 (34%) produjeron Col V y otros tipos de colicinas, 13 (17%) produjeron colicinas diferentes a la Col V, y 11 (14.5%) produjeron únicamente Col V. La resistencia microbiana observada con mayor frecuencia fue contra trimetoprima/sulfa (72%), ampicilina (64.5%), enrofloxacina (55.3%), y ciprofloxacina (47.4%). Se observaron 25 patrones de resistencia múltiple en 66 (86.8%) de las cepas de *E. coli*. La prueba de concentración inhibitoria mínima mostró que la mayoría de las cepas fueron sensibles a concentraciones bajas de gentamicina y kanamicina mientras que la mayoría de las cepas fueron resistentes a la tetraciclina. La prueba de invasividad mostró que las alteraciones predominantes ocasionadas a las células HEp-2 fueron cambios en la forma y la tinción, y en la mayoría de los especímenes se observó un desprendimiento parcial de la monocapa de células. Quince de las cepas invadieron más del 30% de la monocapa de células, ocasionando la formación de puentes intercelulares o proyecciones de tipo filipoidal. Los resultados sugieren la existencia de complejos clonales específicos de cepas de *E. coli* invasoras del intestino adaptadas al huésped aviar. De acuerdo con la información que tenemos, este es el primer estudio que demuestra la presencia de cepas invasivas extraintestinales de *E. coli*.

**Key words:** *Escherichia coli*, yolk sac infection, invasiveness, antibiotic resistance, virulence factors

Abbreviations: APEC = avian pathogenic *Escherichia coli*; Col V = Colicin V; EIEC = enteroinvasive *Escherichia coli*; EPEC = enteropathogenic *Escherichia coli*; ETEC = enterotoxigenic *Escherichia coli*; ExIEC = extraintestinal invasive *Escherichia coli*; IpaH = invasion plasmid antigen H; LPS = lipopolysaccharide; MEM = Eagle's minimal essential medium; MIC = minimal inhibitory concentration; PBS = phosphate-buffered saline; YSI = yolk sac infection

*Escherichia coli* is a common and important bacterial pathogen that causes at least 5% of the mortality in poultry flocks (13,21). Consequently, these bacteria are responsible for significant economic losses to the poultry industry (4,72,81). Pathogenic serogroups of *E. coli* are ubiquitous in environments in which poultry are raised and can cause air sacculitis, pericarditis, peritonitis, salpingitis,

synovitis, osteomyelitis, cellulitis, or yolk sac infections (YSI) (5,19,29,63,65,81).

Recently, *E. coli* strains pathogenic to avian species have begun to be grouped as avian pathogenic *E. coli* (APEC) (9,13,15,17,18,81). Aside from causing embryo mortality (25,26,35), some features of APEC strains include the production of colicin V (15,25,26,

Table 1. Origin and serotypes of the *E. coli* strains included in the study.

O group	<i>ipaH</i> +	Source <sup>A</sup> (H antigen-number)	Total
O2	20	Ha19 (H1-1; H?-1), Ha21 (NM-2), Bro (NM-16)	20
O6	1	Bre (H16-1)	1
O8	1	Ha21 (H21-1)	1
O9	1	Bre (H11-1)	1
O12	1	Bro (H31-1)	1
O19	2	Bro (NM-2)	2
O22	2	Bro (H4-2)	2
O69	1	Ha19 (H38-1)	1
O78	4	Bro (H9-3; H?-1)	4
O81	1	Bro (H31-1)	1
O84	5	Bro (H8-4, NM-1)	5
O103	1	Ha19 (H11-1)	1
O112	—	Ha19 (H19-2)	2
O146	1	Ha19 (H19-1)	1
O152	—	Bro (H6-2)	2
O155	1	Bro (H10-1)	1
O167	2	Ha19 (H4-3)	3
O168	6	Ha19 (NM-1), Bro (NM-1, H5-3, H?-1)	6
OR	10	Bro (H4-1, H5-2, H6-1, H9-3, H31-2, NM-2)	11
O?	8	Ha19 (H4-1), Bro (H4-1, H7-1, H8-3, H31-3, H51-1)	10

<sup>A</sup>Bre = breeder farm; Ha19 = hatchery 19th day; Ha21 = hatchery 21st day; Bro = broiler farm.

27,35,49,63,81), a polysaccharide capsule (17,18,49,81), toxins and cytotoxins (15,17,18,49), F1-type fimbriae (15,17,18,25,27,35, 49,63,81), possession of *iss* genetic element (15,25,26,35), temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh) (15,17,18,25,26,49,63), aerobactin iron-sequestering systems (15,17,18,27,49,63,81), and resistance to the host complement (15,17,18,25,27,35,49,63). Antibiotic resistance profiles and specific serotypes have also been identified in *E. coli* strains that cause colibacillosis (17,18,27,35, 49,81). Kariuki *et al.* (40) mentioned that the APEC group mainly consists of EPEC (enteropathogenic *E. coli*) and ETEC (enterotoxigenic *E. coli*) serovars.

For many years, it was thought that *E. coli* strains associated with YSI cases were avirulent or of low virulence (18,19,29). However, a recent study performed in our laboratory showed that 30% of the *E. coli* isolates recovered from breeder farm, hatchery, and broiler farm samples carried the *ipaH* gene, which has been associated with enteroinvasive *E. coli* (EIEC) strains (70). This observation suggests that invasiveness could play an important role in the development of YSI. EIEC strains are principally associated with human and primate infections, and their participation in the avian diseases is unknown. In this study, different properties of *ipaH* strains, such as serotype, colicin production, antimicrobial susceptibility, and ability to invade cell culture were analyzed in order to determine the characteristics that the strains implicated in the development of yolk sac infection possess.

## MATERIAL AND METHODS

**Strains.** Seventy-six strains previously isolated from putative YSI cases (71) were analyzed. In a previous study (70), the strains were serotyped and analyzed for virulence factors. The *ipaH* gene-positive strains ( $n = 68$ ) and eight more belonging to reported EIEC serogroups (43,44,52,76,83) were analyzed in this study (Table 1).

Strains were recovered from Dorset media (where they had been stored) and cultured onto McConkey and blood agar (Difco Laboratories, Detroit, MI). The obtained cultures were rested in the VITEK® AutoMicrobic System (Vitek AMS; bioMérieux Vitek, Marcy-l'Etoile, France) to confirm their identity.

**Serotyping.** The *ipaH* strains were newly typed to confirm their serotypes. Rabbit sera prepared against 175 somatic (O) and 56 flagellar (H) *E. coli* antigens (SERUNAM, Mexico City, Mexico), were used for typing as previously described by Orskov and Orskov (61). Additionally, 47 specific sera against *Shigella* strains and three more prepared in our laboratory against Mexican *E. coli* strains that do not react with the recognized antiserum scheme were used.

**Colicin production.** One of the most common characteristics of APEC strains is the production of colicin V. Consequently, a test for this trait was performed using the agar overlay method as previously described by Ramírez *et al.* (67). Briefly, strains were cultured overnight in tryptic soy broth at 37 C and plated in duplicate onto LTC agar, supplemented with yeast extract, tryptone, and calcium (1000 ml: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl; pH 7.6 adjusted with 1M Tris; added with 50 mM CaCl<sub>2</sub> and 1% agar). Then the *E. coli* colonies were lysed by chloroform vapor exposure for 15 min. Thereafter, the plates were overlaid with 4.5 ml top soft LTC media (0.6% agar) containing 100 µl of an overnight growth of *E. coli* K12 711, a colicin indicator strain (sensitive to all colicins) or its isogenic mutant sensitive only to colicin V. The overlaid plates were allowed to grow overnight at 37 C and were then observed for the presence of an inhibition halo around colicin-producing colonies. Colicin V, colicin V and other colicins, colicins different from colicin V, and no-colicins producers are the four phenotypes that could be observed (45,67).

**Antimicrobial susceptibility test.** Antimicrobial susceptibility of the strains was determined using the automated VITEK® System for Antibiotic Susceptibility with GNS-100 No. V 4500 (bioMérieux Vitek) cards. The tested antimicrobials included in the card were amikacin, ampicillin, aztreonam, cefazolin, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, ceftizoxime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, nitrofurantoin, piperacillin, ticarcillin/clavulanic acid, robramycin, and trimethoprim/sulfa.

The minimal inhibitory concentrations (MICs) of gentamicin, tetracycline, and kanamycin were determined because these antibiotics are commonly used in local poultry farms and are not included in the VITEK® cards. Test concentrations of gentamicin were 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, and 1.6 µg/ml; and 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, and 1.6 µg/ml for tetracycline and kanamycin. An inoculum of  $3 \times 10^5$  CFU/ml, according to National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (53) was utilized in the assay. MICs were determined by the microdilution agar method using microtiter plates. Performance and evaluation of the MIC determinations followed the recommendations of the NCCLS (54). Ranges of susceptibility were noted along with the MIC that inhibited 90% (MIC90) of the isolates. Two reference strains (*E. coli* ATCC 25922 and *E. faecalis* ATCC 29212) were used for quality control in each set of plates. MIC breakpoints were  $\geq 16$  µg/ml,  $\geq 64$  µg/ml, and  $\geq 16$  µg/ml for gentamicin, kanamycin, and tetracycline, respectively. Determinations were made in triplicate.

Although enrofloxacin is one of the most common quinolones used in the Mexican poultry industry, it is not included in the VITEK® system card. Therefore, sensitivity of the strains to this antimicrobial was determined by the standard disk procedure described by Bauer *et al.* (6). The selection of disk concentrations (5 µg) and zone diameter interpretation was done as recommended by the manufacturer (Difco Laboratories, Detroit, MI) and by the NCCLS (53).

**Invasiveness assay.** The HEp-2 cell invasiveness test was performed as was described by Mellman *et al.* (48). Briefly,  $2.5 \times 10^6$ /ml of HEp-2 cells previously grown to confluence in Eagle's minimal essential medium (MEM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), supplemented with 10% fetal calf serum, were plated onto coverslips on 24-well plates (Costar, Cambridge, MA) with fresh MEM, and incubated overnight at 37 C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Simultaneously, *E. coli* strains were grown overnight in 5 ml of peptone water with D-mannose (3%). The bacterial cultures were centrifuged, washed, and resuspended in MEM without antibiotics. HEp-2 cells on plates were washed and



Table 2. Serogroup and colicin production of *ipaH-* *E. coli* strains associated with yolk sac infection.

O group	No producers	Colicin-producing strains				Total strains
		Total	Col V	Col V and others	Others	
O2		20	4	15	1	20
O9		1			1	1
O19		2		2		2
O22		2	1		1	2
O69		1	1			1
O78	1	3	1	2		4
O84		5			5	5
O103		1		1		1
O112	2	—				2
O152		2			2	2
O167		3		3		3
O168	4	2		2		6
O various <sup>A</sup>	6	—				1
OR	6	5	2	1	2	11
O?	7	3	2		1	10
Total (%)	26	50 (65.8)	11 (14.5)	26 (34.2)	13 (17.1)	76 (100)

<sup>A</sup>O6, O8, O12, O81, O146, and O155, one strain per each serogroup.

each well was refilled with 1 ml of fresh MEM without calf serum or antibiotics, but with 0.5% (wt/vol) of D-mannose. One hundred microliters of overnight-grown bacterial suspension containing  $1.5 \times 10^8$  CFU were added to each well with HEp-2 cells. The plates were incubated for 3 hr in 5% CO<sub>2</sub> at 37 C. After this incubation, the cell cultures were washed three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS). The wells were newly refilled with 1 ml of MEM containing gentamicin (100 µg/ml) and lysozyme (300 µg/ml) and incubated 3 hr more. After this incubation, the medium was pulled off and the cell preparations washed three times with sterile PBS, fixed with methanol for 10 min and Giemsa stained. The coverslips containing the stained HEp-2 cells were washed three more times with deionized water and dried with acetone, xylene-acetone, and xylene. The cells were fixed down with resin on the slips. The preparations were observed in a light microscope with the 100× objective. Positive (EIEC O28 ac) and negative (HB101 K-12) control strains were included in each assay.

Criteria for cytopathic effect include abnormal size or shape of mammalian cells, disruption of membrane, vacuolation, nuclear damage, and altered staining properties of nucleus and cytoplasm (48).

Two independent investigators, who were unaware of the origin of the isolates, examined all coverslips. The inspection of 10 fields routinely distributed in the preparation, each one containing between 15 and 30 cells, was carried out. A strain was considered invasive when at least 1% of the HEp-2 cells contained at least five bacteria in the cytoplasm (48).

## RESULTS

**Biochemical characterization.** The 76 strains analyzed exhibited a positive lactose fermentation reaction, 98.7% were lysine decarboxylase positive through the VITEK® system, and 67.1% exhibited motility in semisolid medium.

**Serotyping.** The serotypes obtained in the previous study (70) were confirmed in this, although 12 of the strains previously identified as OR:NM in this study were serotyped as O2:NM. The relationship between the O antigens identified and *ipaH+* strains showed O2 ( $n = 20$ ), OR ( $n = 11$ ), and nontypable O? ( $n = 10$ ) as the most common serogroups (Table 1). Considering the complete formula (O and H antigens), O2:NM was the predominant serotype isolated from specimens collected both from 21-day-old eggs at the

Table 3. Antimicrobial susceptibility of *ipaH+* *E. coli* strains associated with yolk sac infection.

Antimicrobial agent <sup>A</sup>	Resistance number (%)
Cefoxitin	1 (1.3)
Gentamicin	4 (5.3)
Ceftazidime	5 (6.6)
Nitrofurantoin	8 (10.6)
Cefazolin	11 (14.5)
Piperacillin	30 (39.5)
Ciprofloxacin	36 (47.4)
Ampicillin	49 (64.5)
Trimethoprim/Sulfa	55 (72.4)

<sup>A</sup>All the strains were sensitive to amikacin, aztreonam, cefotaxime, ceftizoxime, imipenem, tobramycin, Ticarcillin/Clavulanic Ac.

hatchery and at the broiler farm. None of the serotypes isolated from specimens from the breeder farm were isolated from specimens collected during a later production stage (Table 1). Although nonmotile strains were the predominant group ( $n = 25$ ), the most common identified flagellar antigens were H4 ( $n = 8$ ), H8 ( $n = 7$ ), and H31 ( $n = 7$ ).

Some serogroups are traditionally associated with disease caused by the EIEC group; in this study, only O112 ( $n = 2$ ), O167 ( $n = 3$ ), and O152 ( $n = 2$ ) were identified.

**Colicin production.** The colicin production assay showed four different patterns that were used to classify the analyzed strains. Fifty (66%) of the *ipaH+* *E. coli* strains were colicin producers (Table 2). Of these, 34% (26/76) were Col V and other colicins positives, 13 (17%) produced colicins other than Col V and 11 (14.5%) produced only Col V.

No relationship between serogroup and colicin production was observed. However, all isolates of the O2 serogroup produced at least one type of colicin and most of these produced Col V and other colicins. Conversely, the O84 strains ( $n = 5$ ) only produced colicins other than Col V (Table 2).

**Antibiotic susceptibility.** The VITEK® system revealed that all strains were sensitive to amikacin, aztreonam, cefotaxime, ceftizoxime, imipenem, tobramycin, and ticarcillin/clavulanic acid. However, 89.5% ( $n = 68$ ) of the strains were resistant to at least one antibiotic. The major resistance frequencies were against trimethoprim/sulfa (72%), ampicillin (64.5%), and ciprofloxacin (47.4%) (Table 3). Conversely, a high number of enrofloxacin-resistant strains (55.3%) were identified.

Twenty-five different multiresistance patterns were observed among 66 of the 76 strains tested (86.8%) (Table 4). Only two isolates showed resistance against one antibiotic (one to ampicillin and the other against enrofloxacin); despite both belonging to the O2 serogroup, they were isolated from different sources (hatchery at 19th day and at broiler farm). Whereas resistance was observed in bacteria recovered from all the different stages of production, in only two cases were the same multiresistance patterns exhibited by a particular serotype isolated from more than one source. In these cases, resistance to enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim/sulfa was shared by O2:NM isolated from both the hatchery at the 21st day and the broiler farm, and resistance to ampicillin, enrofloxacin, ciprofloxacin, piperacillin, and trimethoprim/sulfa was shared by O168:NM isolated from the hatchery at the 19th day and the broiler farm. Several serotypes collected from the broiler farm exhibited numerous multiresistance patterns and the widest multi-drug-resistant group (13 strains) was exclusively formed by O2:NM strains, which exhibited resistance to enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim/sulfa. Serotype O?:H4 exhibited the

Table 4. Resistance patterns determined in *ipaH+* *E. coli* strains associated with yolk sac infection.

Resistance patterns <sup>A</sup>	Number of strains
None	8
AM	1
ENO	1
AM, ENO	1
AM, PIP	3
AM, STX	5
ENO, CIP	4
ENO, STX	1
AM, ENO, CIP	2
AM, PIP, STX	7
AM, CZ, PIP	1
ENO, CIP, STX	13
AM, PIP, STX	1
AM, ENO, CIP, STX	4
AM, CZ, F/M, STX	1
AM, CZ, PIP, STX	2
AM, CZ, CAZ, F/M, STX	1
AM, CZ, CAZ, PIP, STX	2
AM, CZ, GM, PIP, STX	1
AM, CZ, F/M, PIP, STX	1
AM, ENO, CIP, GM, STX	1
AM, ENO, CIP, F/M, STX	1
AM, ENO, CIP, PIP, STX	9
AM, ENO, GM, F/M, STX	1
AM, CZ, CAZ, ENO, PIP, STX	1
AM, ENO, CIP, F/M, PIP, STX	2
AM, CZ, FOX, CAZ, ENO, GM, F/M, STX	1
Total	76

<sup>A</sup>AM = ampicillin; ENO = enrofloxacin; PIP = piperacillin; STX = trimethoprim/sulfa; CIP = ciprofloxacin; CZ = cefazolin; F/M = nitrofurantoin; CAZ = ceftazidime; GM = gentamicin; FOX = cefoxitin.

highest multiresistance pattern (eight antibiotics) and was isolated from the hatchery at the 19th day.

The gentamicin MIC test showed that 70 strains (92.2%) were sensitive to the lowest concentration of gentamicin, whereas only three of the strains were sensitive to 12.5 µg/ml. Seventy-five percent of the strains were sensitive to ≤1.6 µg/ml of kanamycin/ml and 23.7% (*n* = 18) sensitive to ≥50 µg/ml. In contrast, most of the

strains were resistant to tetracycline; only 9.2% (*n* = 7) were inhibited with 3.12 µg/ml and 88.2% (*n* = 67) of the isolates were resistant to ≥50 µg/ml.

***In vitro* invasiveness assay.** Cytotoxic effects, including distortion of size or shape, disruption of membrane, vacuolation, nuclear damage, altered staining properties of nucleus and cytoplasm, and/or detachment of monolayer were seen in the HEp-2 cell preparations. The predominant alterations were the changes of shape and staining (Fig. 1a) compared with the negative control (Fig. 2). The percentage of cells infected by the different strains is presented in Table 5. A common feature in all the preparations was that the size of the bacteria observed in the HEp-2 cells was smaller than the positive control (Fig. 1a,b). Although in most of the specimens, a partial detachment was seen, 15 strains invaded more than 30% of the cells, causing the formation of intercellular bridges or filipoidal-like protrusions (Fig. 1b). In 10% of the preparations, the monolayer was completely detached.

## DISCUSSION

EIEC and *Shigella* species are considered to be closely related (43,47,52,66,73,79,83,84) and, for some time, it has been clear that they could be placed in the same species (66). Both are generally lysine decarboxylase negative, nonmotile, and lactose negative (7,47,52,73,83). Our results showed that, despite carrying the *ipaH* gene characteristic of the EIEC group, our strains do not share the characteristics mentioned above.

Although only a few authors report EIEC strains able to decarboxylate lysine (30,47,76,83), our results showed that 98.6% (*n* = 75) of the studied strains were lysine decarboxylase positive. Regarding motility, 67.1% (43/51) of the *ipaH+* strains were motile; this finding has been previously detected by some authors, who identified motile strains belonging to the EIEC group (7). In a study performed in Thailand (83), EIEC strains isolated from children with diarrhea were analyzed for lactose fermentation and the percentage of positive strains was higher (65%) than lactose-negative EIEC strains (35%); similarly, in the present work, all *ipaH+* strains analyzed exhibited a positive lactose reaction. Therefore, the analyzed strains in the present study seem to belong to a different group than EIEC because they do not share these biochemical characteristics. Serotypes such as O28ac; O29, O42, O112ac; O124,

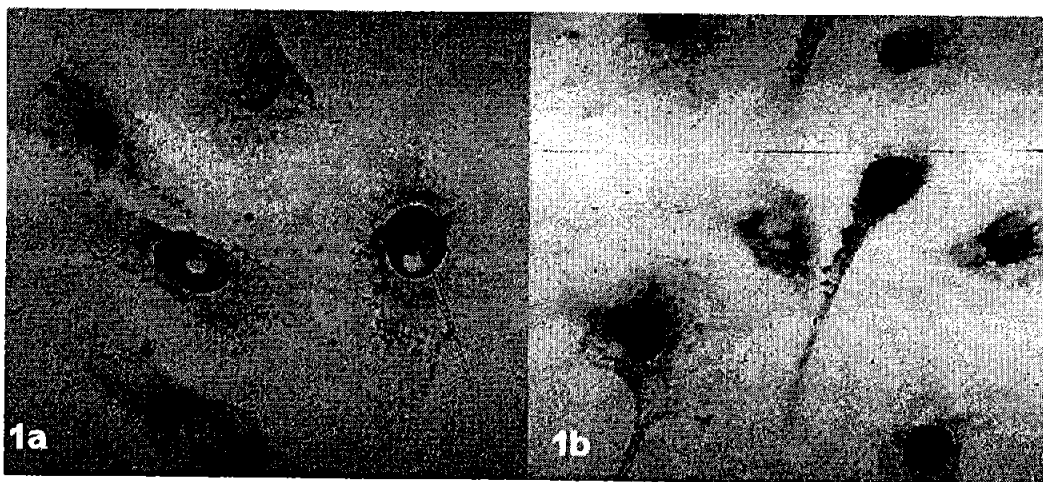


Fig. 1. (a) HEp-2 mammalian culture infected with *E. coli*. Host cells exhibit intracellular bacteria. (b) Filipoidal-like protrusions in HEp-2 cells in an *in vitro* invasiveness assay. Specimens were stained with Giemsa dye. Magnification 100X.

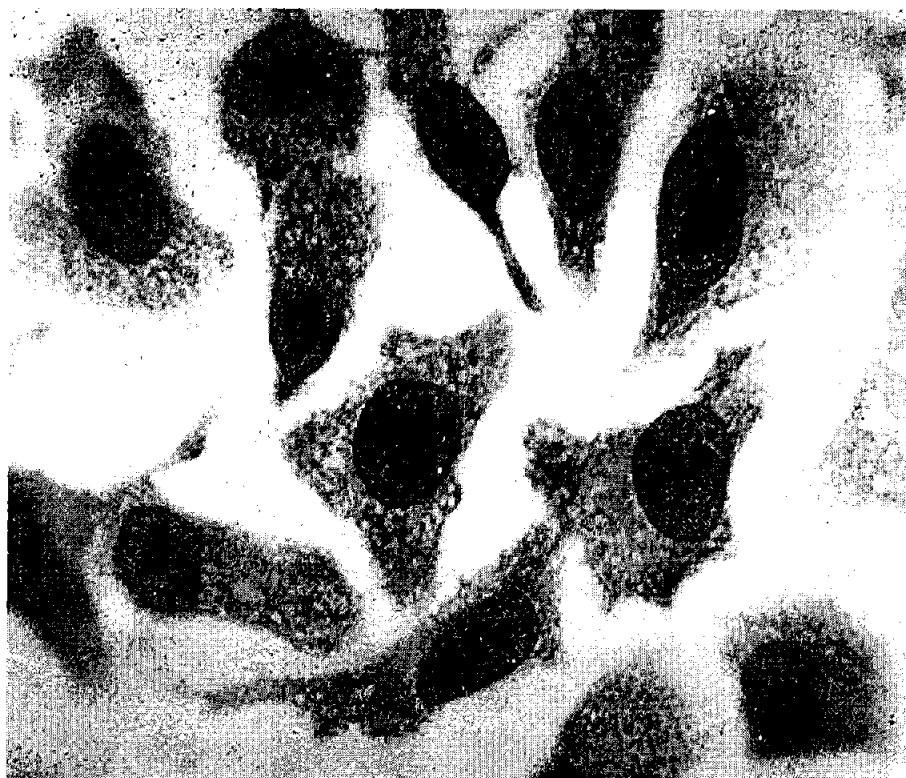


Fig. 2. Negative control of HEp-2 mammalian culture infected with *E. coli* (HB 101 K-12). Specimens were stained with Giemsa dye. Magnification 100X.

O136, O143, O144, O152, O159, O164, and O167 are considered as classical EIEC strains (7,43,44,52,76,79,83). However, in this study, only two of our *ipaH+* strains were included in those groups, and 96% belonged to other serotypes.

In poultry diseases, the serogroups most frequently identified are O1, O2, O78, and O untypeable (2,27,29,31,38,63,64). In the present study, O2 ( $n = 20$ ) was the most common serogroup followed by OR ( $n = 11$ ) and O? ( $n = 10$ ). Barnes *et al.* (4) mentioned that most serotypes isolated from poultry are pathogenic only for birds; conversely, some O2 strains have been associated with urinary tract infections and meningitis in humans. Thus, the clonal relationship among *E. coli* strains is not necessarily reflected by their serotype (1,12).

It has been reported that humans and subhuman primates are the only natural hosts for EIEC strains (30,51). However, the *ipaH+* strains analyzed in the present study were isolated from poultry samples. This fact, along with the differences found in the biochemical and serotyping tests, suggests that our strains belong to specific clones that possess particular traits that make them able to cause disease in poultry.

Avian pathogenic *E. coli* strains have been grouped as APEC (9,13,15,17,18,81). However, omphalitis and yolk sac infection isolates frequently are not included in this group because some authors have mentioned that these strains are just opportunistic and nonpathogenic agents (18,19).

Several studies have shown that pathogenic avian *E. coli* strains produce colicins, which could be implicated in *in vivo* pathogenicity (8,16,20,21,25,27,35,63); but this trait is not shared by EIEC strains (22), whereas 66% of the *ipaH+* strains analyzed in this study were colicinogenic. Col V, an 88-amino-acid polypeptide (87), is one of

the most common among 20 known colicins (86). It is found primarily among virulent bacteria implicated in extraintestinal infections in both humans and animals (44,78,86) and is related to the high mortality observed in the embryo lethality assay (27). This colicin could be considered as a virulence trait because it contributes to the elimination of competing microorganisms (3,11,65). Moreover, Col V was able to inhibit the growth of several Shiga-like-toxin-producing strains (37). Therefore, colicinogenic bacteria have an overall competitive advantage over colicin-susceptible wild-type bacteria, even if the colicinogenic bacteria are initially rare (3,25,34,42,62). On the other hand, the presence of Col V could indicate the presence of other virulence factors because Col V plasmids encode for other traits (36,44,81,86). In this study, 48.7% of the strains produced Col V, which is lower than the percentage of colicinogenic strains found in other reports (35,49,65,86), where colicin producers are between 72% and

Table 5. HEp-2 invasiveness assay in *ipaH+* *E. coli* strains isolated from yolk sac infection.

% Host cell infected	No. of strains (%)
15-20	15 (19.7)
21-25	20 (26.3)
26-30	18 (23.7)
31-35	5 (6.6)
36-40	3 (4)
>40	7 (9.2)
MD <sup>A</sup>	8 (10.5)

<sup>A</sup>Monolayer detachment.

87%. However, our results agree with a similar study performed in Mexico (67).

Lior (44) mentioned that there is no correlation between serotype and colicin production because colicins are plasmid-encoded and potentially any strain could gain or lose these plasmids (44). In the present study, it was observed that most of the strains belonging to the O2 serogroup produced at least one colicin type, whereas O84 strains only produced colicins different from Col V.

Since 1950, control measures for *E. coli*-associated diseases have depended mostly on the prophylactic and therapeutic use of certain antibiotics. However, this practice has provided a selective pressure for antimicrobial resistance genes and, as a consequence, many bacteria associated with chickens and poultry meat are resistant to antimicrobial agents (5,14,24,40,55). The increasing resistance observed among avian strains has received considerable international attention (14,40) because they are a potential source of virulence genes that could be transmitted (4,12,58).

In the present study, 64.5% of the strains were ampicillin resistant. Besides the common and widespread use of ampicillin in the poultry industry, Bass *et al.* (5) presumed that the resistance against this antibiotic could be a reflection of cross-resistance to ceftriaxone, a third-generation cephalosporin currently available as a therapeutic for poultry. In fact, we found resistant strains against other cephalosporins not currently used as therapeutic agents in avian medicine, such as cefazolin, ceftazidime, and ceftiofur. Resistance to two or more classes of antibiotics is now commonplace in both veterinary (33) and human medicine (5). An efficient route of acquisition and vertical and horizontal dissemination of resistance determinants is through mobile elements, including plasmids, transposons, and gene cassettes in integrons (68). Johnson *et al.* (36) analyzed the relationship between virulence and resistance in plasmids, finding that a 30-kb region contains genes encoding for ampicillin resistance; thus, these mobile components could be important in the pathogenesis and evolution of APEC strains.

Enrofloxacin, a fluorinated quinolone, was developed exclusively for use in animals, whereas ciprofloxacin is a potent antimicrobial agent used in human therapy (32,69). In the present study, high rates of resistance to both antimicrobials (55.3% and 47.4%, respectively) were observed. This finding could be due to a cross-resistance among these fluoroquinolones or because enrofloxacin is partially metabolized in the chicken liver to ciprofloxacin (32). Several studies have reported an increase in the resistance to quinolones; however, the percentages in those cases are generally low compared with the percentages observed in this study (12,55).

Several studies have shown that most of the isolated strains from avian colibacillosis are resistant to tetracycline and to different sulfonamides (5,12,14,40,58,63,81). Our results show a high number of resistant strains against tetracycline (88.2%). Moreover, several strains were resistant against antimicrobials not currently used in the poultry industry; similar findings have been reported previously and could be associated with transferable plasmids (14,36).

It has been documented that gentamicin resistance may be due to the inclusion of this antibiotic with the Marek's vaccine, administered to almost all poultry *in ovo* in other countries (5). In our study, most of the isolates (93.4%) were sensitive to this antibiotic. This result was important because this antibiotic is used in the invasiveness assay to eliminate bacteria that remain outside the cells, that is, noninvasive bacteria (50,57,82).

A relationship between virulence and resistance to antibiotics has been discussed recently (46). The development of resistance and virulence are both adaptive mechanisms acquired to enhance survival under stressful conditions (36). Therefore, the widespread dissemination of antibiotic resistance among bacterial populations could

maintain or even increase the number of harmful bacteria involved in infections.

Of particular interest in our study was the high incidence of multiple-drug-resistant strains. Whereas only eight strains were sensitive to all the tested antibiotics (Table 4) and two were resistant to one antimicrobial, 87% ( $n = 66$ ) were resistant to more than two antibiotics. The recovery of the multiple-drug-resistant strains from food animals has been widely documented (5,12,41,60). In particular, *E. coli* isolated from retail meats have been found resistant to frontline therapeutic antimicrobials, such as trimethoprim-sulphamethoxazole, third-generation cephalosporins, and fluoroquinolones (75).

Invasion is defined as a transfer of the agent from one cell to another of the same tissue or passage across a membrane barrier to infect another tissue. *Shigella* spp. and EIEC have the ability to invade guinea pig conjunctiva (Sereny test) (7,80). However, since the early 1970s, increasing attention has been focused on the use of cell culture assays (48,50) because they represent a uniform experimental system under which complex biological phenomena can be studied with defined conditions (57).

An initial report stated that it is necessary that a smooth somatic antigen be expressed for invasiveness to occur (23); however, Okamura *et al.* (59) concluded that oligosaccharides of both O antigens and rough cores of lipopolysaccharides (LPS) in *Shigella* spp. strains do not affect the ability of an invasive strain to penetrate tissue culture cells. Our observations support Okamura's work because all of our strains were positive for the invasiveness assay despite some of them ( $n = 11$ ) expressing a rough LPS (OR strains).

Most of the expected cytopathic characteristics were seen in the evaluated preparations. A common feature among *ipath+* strains was the change of shape of the mammalian cells and altered staining properties, as well as disruption of the cell membrane (Fig. 1,b). Sometimes data could not be obtained because the monolayer detached from the slide during the infection phase ( $n = 8$ ). Detachment produced by invasive strains may be attributed to cytotoxin production (48).

A remarkable result was that bacteria inside the cells were smaller than EIEC human strains; in fact, when a Gram-stained preparation was made from fresh cultures, the size of the bacteria was similar to those observed within mammalian cells. It is known that invasion phenotype is temperature regulated, requiring 37 C for growth (79,80). In fact, culture conditions, such as bacterial growth media, temperature, oxygen, growth state, can alter the assay (82). A possible explanation for the reduced size of the bacteria could be the source of isolation because our strains were recovered from poultry, for which body temperature is around 40 C. Obviously, APEC strains are adapted to cause damage under this condition, and the change of the environment could affect their size.

An important finding was that most of the analyzed strains produced extensions of the cytoplasm (Fig. 1b). These surface extensions are induced by *Shigella* spp. and EIEC (10,28,48,56,74,85). After the entry, the bacterium rapidly lyses the phagosomal membrane, multiplies freely in the cytosol, and, during this multiplication step, the bacteria can move intracellularly, leading to the formation of cellular protrusions that are driven by the bacterium and propel it into adjacent cells (10,28,48,56,74,85).

The current study has defined some characteristics of virulent *E. coli* strains associated with yolk sac infection and strongly suggest the existence of a limited number of clone complexes that possess particular traits that make them able to cause disease in poultry. Moreover, because most of our strains belonged to serotypes not previously reported as EIEC, this study provided the opportunity to study the role of specially adapted clones of extraintestinal-invasive

*E. coli* (ExIEC) strains able to be implicated in poultry diseases. To our knowledge, this is the first study that demonstrates the presence of ExIEC related to EIEC strains in a host different from primates, including humans. This information may be useful in improving our understanding of the pathogenesis of ExIEC infections. Further study is needed in order to establish the clonal relationship between avian ExIEC strains and classic EIEC and APEC strains.

## REFERENCES

- Achtman, M., M. Heuzenroeder, B. Kusecek, H. Ochman, D. Caugant, R. K. Selander, V. Väisanen-Rhen, T. K. Korhonen, S. Stuart, F. Orskov, and I. Orskov. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect. Immun.* 51:268–276. 1986.
- Allan, B. J., J. V. Van den Hurk, and A. A. Potter. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Can. J. Vet. Res.* 57:146–151. 1993.
- Alonso, G., G. Vilchez, and V. L. Rodríguez. How bacteria protect themselves against channel-forming colicins. *Int. Microbiol.* 3:81–88. 2000.
- Barnes, J. H., J. P. Vaillancourt, and W. B. Gross. Colibacillosis. In: *Diseases of poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, ed. Iowa State Press, Iowa City, Iowa, pp. 631–656. 2003.
- Bass, L., C. A. Liebert, M. D. Lee, A. O. Summers, D. G. White, S. G. Thayer, and J. J. Maurer. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. 43:2925–2929. 1999.
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turk. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493–496. 1966.
- Beutin, L., K. Gleier, I. Kontny, P. Echeverria, and F. Scheutz. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. *Epidemiol. Infect.* 118:190–205. 1997.
- Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, and J. Blanco. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrototoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with *in vivo* pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* 35:2953–2957. 1997.
- Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, W. H. Jansen, V. García, M. L. Vázquez, and J. Blanco. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet. Microbiol.* 61:229–235. 1998.
- Bourdet-Sicard, R., C. Egile, P. J. Sansonetti, and G. T. Van Nhieu. Diversion of cytoskeletal processes by *Shigella* during invasion of epithelial cells. *Microbes Infect.* 2:813–819. 2000.
- Boyer, A. E., and P. C. Tai. Characterization of the *evaA* and *cvi* promoters of the colicin V export system: iron-dependent transcription of *evaA* is modulated by downstream sequence. *J. Bacteriol.* 180:1662–1672. 1998.
- Caya, F., J. M. Fairbrother, L. Lessard, and S. Quessy. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses. *J. Food Prot.* 62:741–746. 1999.
- Chansiripornchai, N., P. Ramasoota, J. Sasipreeyajan, and S. B. Svenson. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* 80:75–83. 2001.
- Cloud, S. S., J. K. Rosenberger, P. A. Fries, R. A. Wilson, and E. M. Odor. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. *Avian Dis.* 29:1084–1093. 1985.
- Delicato, E. R., B. Guimarães de Brito, L. C. J. Gaziri, and M. C. Vidotto. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 94:97–103. 2003.
- De Rosa, M., M. D. Ficken, and H. J. Barnes. Acute airsacculitis in untreated and cyclophosphamide-pretreated broiler chickens inoculated with *Escherichia coli* or *Escherichia coli* cell-free culture filtrate. *Vet. Pathol.* 29:68–78. 1992.
- Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299–316. 1999.
- Dias da Silveira, W., A. Ferreira, M. Brocchi, L. M. de Hollanda, A. F. Pestana de Castro, Y. A. Tatsumi, and M. Lancellotti. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 85:47–53. 2002.
- Dias da Silveira, W., A. Ferreira, M. Lancellotti, I. A. G. C. D. Barbosa, D. S. Leite, A. F. P. de Castro, and M. Brocchi. Clonal relationship among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. *Vet. Microbiol.* 89:323–328. 2002.
- Emery, D. A., K. V. Nagaraja, D. P. Shaw, J. A. Newman, and D. G. White. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis.* 36:504–511. 1992.
- Fantanaati, F., W. D. Silveira, and A. F. P. Castro. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 41:75–86. 1994.
- Faundez, G., G. Figueroa, M. Troncoso, and F. C. Cabello. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. *J. Clin. Microbiol.* 26:928–932. 1988.
- Formal, S. B., and R. B. Hornick. Invasive *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 137:641–644. 1978.
- Geornaras, I., J. W. Hastings, and A. V. Holy. Genotypic analysis of *Escherichia coli* strains from poultry carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1940–1944. 2001.
- Gibbs, P. S., J. J. Maurer, L. K. Nolan, and R. E. Wooley. 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.* 47:370–379. 2003.
- Gibbs, P. S., and R. E. Wooley. Comparison of the intravenous chicken challenge method with the embryo lethality assay for studies in avian colibacillosis. *Avian Dis.* 47:672–680. 2003.
- GINNS, C. A., M. L. Benham, L. M. Adams, K. G. Whitehead, K. A. Bettelheim, B. S. Crabb, and G. F. Browning. Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infect. Immun.* 68:1535–1541. 2000.
- Gouin, E., H. Gantelet, C. Egile, I. Lasa, H. Ohayon, V. Villiers, P. Gounon, and P. J. Sansonetti. A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J. Cell Sci.* 112:1697–1708. 1999.
- Gross, W. G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: *Escherichia coli* in domestic animals and human. C. L. Gyles, ed. Cab International, Wallingford, United Kingdom. pp. 237–259. 1994.
- Harris, J. R., I. K. Wachsmuth, B. R. Davis, and M. L. Cohen. High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. *J. Infect. Dis.* 153:1295–1298. 1982.
- Ike, K., K. Kume, K. Kawahara, and H. Danbara. Serotyping of O and pilus antigens of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52:1023–1027. 1990.
- Intorre, L., G. Mengozzi, S. Bertini, M. Bagliacca, E. Luchentti, and G. Soldani. The plasma kinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in the Muscovy duck. *Vet. Res. Commun.* 21:127–136. 1997.
- Irwin, R. J., S. A. McEwen, R. C. Clarke, and A. H. Meek. The prevalence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and antimicrobial resistance patterns of nonverocytotoxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* in Ontario broiler chickens. *Can. J. Vet. Res.* 53:411–418. 1989.
- James, R., C. N. Penfold, G. R. Moore, and C. Kleantous. Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins. *Biochimie* 84:381–389. 2002.
- Jeffrey, J. S., L. K. Nolan, K. H. Tonooka, S. Wolfe, C. W. Giddings, S. M. Horne, S. L. Foley, A. M. Lynne, J. O. Ebert, L. M. Elijah, G. Bjorklund, S. J. Pfaff-McDonough, R. S. Singer, and C. Doerkott. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis.* 46:48–52. 2002.
- Johnson, T. J., J. Skyberg, and L. K. Nolan. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian Dis.* 48:351–360. 2004.
- Jordi, B. J. A. M., K. Boutaga, C. M. E. Van Heeswijk, F. Van Knapen, and L. J. A. Lipman. Sensitivity of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains for colicins under different experimental conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 204:329–338. 2001.

38. Kapur, V., D. G. White, R. A. Wilson, and T. S. Whittam. Outer membrane protein patterns mark clones of *Escherichia coli* O2 and O78 strains that cause avian septicemia. *Infect. Immun.* 60:1687-1691. 1992.
39. Kariuki, S., C. Gilks, J. Kimari, J. Muyodi, B. Getty, and C. A. Hart. Carriage of potentially pathogenic *Escherichia coli* in chickens. *Avian Dis.* 46:721-724. 2002.
40. Kariuki, S., C. Gilks, J. Kimari, A. Obanda, J. Muyodi, P. Waiyaki, and C. A. Hart. Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:472-476. 1999.
41. Kolar, M., R. Panticek, J. Bardon, I. Vagnerova, H. Typovska, I. Valka, and J. Doskar. Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry. *Vet. Med.-Czech.* 47:52-59. 2002.
42. Law, C. J., C. N. Penfold, D. C. Walker, G. R. Moore, R. James, and C. Kleanthous. OmpF enhance the ability to BruB to protect susceptible *Escherichia coli* cells from colicin E9 cytotoxicity. *FEBS Lett.* 545:127-132. 2003.
43. Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigen, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389. 1987.
44. Lior, H. Classification of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles, ed. Cab International, Wallingford, United Kingdom. pp. 237-259. 1994.
45. López-Alvarez, J. Genetic and molecular characterization of the Vir plasmid of septicemic *Escherichia coli*. Ph.D. thesis. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. 1978.
46. Martínez, J. L., and F. Baquero. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:647-679. 2002.
47. Martínez, M. B., T. S. Whittam, E. A. McGraw, J. Rodrigues, and L. R. Trabulsi. Clonal relationship among invasive and non-invasive strains of enteroinvasive *Escherichia coli* serogroups. *FEMS Microbiol. Lett.* 172:145-151. 1999.
48. Mehlman, I. J., E. L. Eide, A. C. Sanders, M. Fishbein, and C. G. Aulisio. Methodology for recognition of invasive potential of *Escherichia coli*. *J. AOAC.* 60:546-562. 1977.
49. Mellata, M., R. Bakour, E. Jacquemin, and J. G. Mainil. Genotypic and phenotypic characterization of potential virulence of intestinal avian *Escherichia coli* strains isolated in Algeria. *Avian Dis.* 45:670-679. 2001.
50. Miller, V. L. Tissue-culture invasion: fact or artifacts? *Trends Microbiol.* 3:69-71. 1995.
51. Murayama, S. Y., T. Sakai, S. Makino, T. Kurata, C. Sasakawa, and M. Yoshikawa. The use of mice in the Sereny test as a virulence assay of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 51:696-698. 1986.
52. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201. 1998.
53. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Tentative guideline M26-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA. 1992.
54. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. NCCLS document M31-A. Wayne, PA. 1999.
55. Ngeleka, M., L. Brereton, G. Brown, and J. M. Fairbrother. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iucDNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis.* 46:143-152. 2002.
56. Niebuhr, K., S. Giuriato, T. Pedron, D. J. Philpott, F. Gaits, J. Sable, M. P. Sheetz, C. Parsor, P. J. Sansonetti, and B. Payrastrre. Conversion of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> into PtdIns(5)P by the *S. flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J.* 21:5069-5078. 2002.
57. Nielsen, D. W., C. E. Chambers, and S. L. Stockman. Quantitation of HeLa cell monolayer invasion by *Shigella* and *Salmonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 22:897-902. 1985.
58. Ojeniyi, A. A. Direct transmission of *Escherichia coli* from poultry to humans. *Epidem. Inf.* 103:513-522. 1989.
59. Okamura, N., T. Nagai, R. Nakaya, S. Kondo, M. Murakami, and K. Hisatsune. HeLa cell invasiveness and O antigen of *Shigella flexneri* as separate and prerequisite attributes of virulence to evoke keratoconjunctivitis in guinea pigs. *Infect. Immun.* 39:505-513. 1983.
60. Oppeggaard, H., T. M. Steinum, and Y. Wasteson. Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3732-3734. 2001.
61. Orskov, F., and I. Orskov. Serotyping of *Escherichia coli*. In: *Methods of microbiology*, vol. 14. T. Bergan, ed. Academic Press, London. pp. 43-112. 1984.
62. Pagie, L., and P. Hogeweg. Colicin diversity: a result of evolutionary dynamics. *J. Theor. Biol.* 196:251-261. 1999.
63. Peighambari, S. M., J. P. Vaillancourt, R. A. Wilson, and C. L. Gyles. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. *Avian Dis.* 39:116-124. 1994.
64. Phukan, A., C. C. Kalita, and G. N. Dutta. Isolation, identification and serotyping of *Escherichia coli* from poultry. *Indian J. Anim. Sci.* 60:556-557. 1990.
65. Pinto da Rocha, A. C. G., A. Bernardes da Silva, B. Guimaraes de Brito, H. L. De Souza Moraes, A. Pontes Pontes, M. C. Cé, V. Pinheiro do Nascimento, and C. T. Pippi Salle. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the South of Brazil. *Avian Dis.* 46:749-753. 2002.
66. Pupo, G. M., R. Lan, and P. R. Reeves. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:10567-10572. 2000.
67. Ramírez, S. R. M., S. A. Moreno, and M. Y. Almanza. Factores de virulencia de *Escherichia coli* aviar asociados a la colisepticemia en pollos de engorde. *Rev. Argent. Microbiol.* 33:52-57. 2001.
68. Recchia, G. D., and R. M. Hall. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 14:3015-3027. 1995.
69. Riesenfeld, C., M. Everett, L. J. V. Piddock, and B. G. Hall. Adaptive mutations produce resistance to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2059-2060. 1997.
70. Rosario, C. C., C. C. López, I. G. Téllez, O. A. Navarro, R. C. Anderson, and C. C. Eslava. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead in shell embryos and chicken with yolk sac infection. *Avian Dis.* 48:791-802. 2004.
71. Rosario, C. C., I. G. Téllez, C. C. López, F. J. Villaseca, R. C. Anderson, and C. C. Eslava. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs and neonatal broilers with yolk sac infection. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 46:12-16. 2004.
72. Rosenberger, J. K., P. A. Fries, S. S. Cloud, and R. A. Wilson. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. *Avian Dis.* 29:1094-1107. 1985.
73. Salyers, A. A., and D. D. Whitt. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. American Society Microbiology Press, Washington, DC. 1994.
74. Sansonetti, P. J. Bacterial pathogens, from adherence to invasion: comparative strategies. *Med. Microbiol. Immunol.* 182:223-232. 1993.
75. Schroeder, C. M., D. G. White, and J. Meng. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food. Microbiol.* 21:249-255. 2004.
76. Silva, R. M., R. F. Toledo, and L. R. Trabulsi. Biochemical and cultural characterization of invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 11:441-444. 1980.
77. Skoudy, A., G. T. Van Nhieu, N. Mantis, M. Arpin, J. Mounier, P. Gounon, and P. Sansonetti. A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* 112:2059-2068. 1999.
78. Smajs, D., S. E. Karpathy, J. Smarda, and G. M. Weinstock. Colicins produced by the *Escherichia fergusonii* strains closely resemble colicins encoded by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208:259-262. 2002.
79. Small, P. L. C., and S. Falkow. Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 56:225-229. 1988.
80. Small, P. L. C., R. R. Isberg, and S. Falkow. Comparison of the ability of enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 55:1674-1679. 1987.

81. Stehling, E. G., T. Yano, M. Brocchi, and W. Dias da Silveira. 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.* 95:111-120. 2003.
82. Tang, P., V. Foubister, M. G. Pucciarelli, and B. B. Finlay. Methods to study bacterial invasion. *J. Microbiol. Methods.* 18: 227-240. 1993.
83. Taylor, D. N., P. Echeverria, O. Sethabutr, C. Pitarangsi, U. Leksomboon, N. R. Blachlow, B. Rowe, R. Gross, and J. Cross. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1362-1366. 1988.
84. Toledo, M. R. F., M. H. L. Reis, R. G. Almeida, and L. R. Trabulsi. Invasive strain of *Escherichia coli* belonging to O group 29. *J. Clin. Microbiol.* 9:288-289. 1979.
85. Van Nhieu, G. T., E. Caron, A. Hall, and P. J. Sansonetti. IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.* 18:3249-3262. 1999.
86. Wooley, R. E., J. Brown, P. S. Gibbs, L. K. Nolan, and K. R. Turner. Effect of normal intestinal flora of chickens on colonization by virulent colicin V-producing, avirulent, and mutant colicin V-producing avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 38:141-145. 1994.
87. Zhang, L. H., M. J. Fath, H. K. Mahanty, P. C. Tai, and R. Kolter. Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics* 141:25-32. 1995.